

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.489>

<https://orcid.org/0000-0002-2852-272X>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Aurimas Stulpinas

Baltymų kinazių MAPK ir AKT
tarpusavio ryšio bei priklausomumo
nuo užląstelinių kontaktų tyrimai
plaučių vėžio kilmės ląstelių
modeliuose

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2023

Disertacija rengta 2014–2022 metais Vilniaus universitete, Biochemijos institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (stipendija už akademinis pasiekimus).

Mokslinė vadovė – dr. Audronė V. Kalvelytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biofizika – N 011)

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Sonata Jarmalaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

Dr. Julius Bogomolovas (Kalifornijos universitetas, JAV, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Gediminas Čepinskas (Lawson Sveikatos mokslų institutas, Kanada, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Violeta Jonušienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Vytautas Kašėta (Inovatyvios medicinos centras, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2023 m. liepos mėn. 3 d. 15 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro 401 auditorijoje. Adresas: (Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva).

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.489>

<https://orcid.org/0000-0002-2852-272X>

VILNIUS UNIVERSITY

Aurimas Stulpinas

Investigation of Protein Kinase MAPK and AKT Crosstalk and Dependencies on Extracellular Contacts in Lung Cancer-Derived Cell Models

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2023

This research was carried out between 2014 and 2022 in Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University.

The study was supported by Research Council of Lithuania (support for PhD students – doctoral scholarship).

Academic supervisor: Dr. Audronė V. Kalvelytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biophysics – N 011)

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

Chairman – Prof. Dr. Sonata Jarmalaitė (Vilnius University, Natural sciences, Biology – N 010).

Members:

Dr. Julius Bogomolovas (University of California San Diego (USA), Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Gediminas Čepinskas (Lawson Health Research Institute (Canada), Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Violeta Jonušienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Vytautas Kašėta (Centre for Innovative Medicine, Natural Sciences, – Biochemistry N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 15:00 on 3rd of July, 2023 in Room 401 of the Life Sciences Center, Vilnius University.

Address: Saulėtekio al. 7, Room No. 401, Vilnius, Lithuania

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

SANTRUMPOS

- A549 – žmogaus plaučių adenokarcinomos ląstelių linija; iš alveolių bazinio epitelio.
- AKT – signalą perduodanti serino/treonino kinazė
- AKTi – *AKT inhibitor VIII*, slopiklis
- APC – alofikocianinas, raudonos šviesos fluorochromas (tėkmės citometrijoje)
- BSA – „*bovine serum albumin*“, jaučio serumo albuminas
- CAP – kاپivasertibas, AKT slopiklis, vaistas
- CSC – „*cancer stem cells*“ – vėžio kamieninės ląstelės
- CD24, CD44 ir kt. – įvairios paviršinės molekulės, kurių buvimas naudojamas ląstelių charakterizavimui
- DM – DMSO – tirpiklis dimetilsulfoksidas
- ECM – „*extracellular matrix*“, užląstelinis substratas
- ERK – „*extracellular signal-regulated kinase*“ – MAP kinazė, reguliuojama užląstelinių signalų
- FAK – „*focal adhesion kinase*“, fokalinė (židinio) prilipimo kinazė, perduoda signalą nuo integrinų
- FDA – „*Food and Drug Administration*“ – JAV organizacija, tvirtinanti vaistus
- FITC – fluoresceino izotiocianatas, žalios spalvos fluorochromas (tėkmės citometrijoje)
- IDE – idelalisibas, PI3K slopiklis, vaistas
- cJUN – transkripcijos veiksnys, JNK substratas; cJun
- JNK – transkripcijos veiksnio cJun N-galo kinazė; kartu su P38 dar vadinama SAPK
- K562 – žmogaus limfoblastinių ląstelių linija, iš mieloidinės leukemijos
- LCL1, LCL2... – „*lung cancer cell line No.1, 2*“ ... – pirminės plaučių vėžio ląstelių linijos
- MAPK – „*mitogen-activated protein kinase*“ – mitogenais aktyvinama baltymų kinazė
- MEK – „*MAPK ERK kinase*“ – kinazę ERK aktyvinanti aukštesnioji kinazė
- MFI – „*median fluorescence intensity*“ (tėkmės citometrijoje) – vidutinis fluorescencijos intensyvumas
- Myo – iš triušio raumens gauta kamieninių ląstelių linija; naudota kaip sveikų ląstelių kontrolė
- NSCLC – „*non-small cell lung cancer*“, nesmulkialąstelinis plaučių vėžys
- P38 – 38 kDa svorio MAP kinazė; MAPK14

PBS – „*phosphate buffered saline*“ – fosfatinis natrio chlorido buferis, fiziologinis tirpalas

PE – fikoeritinas, raudonos spalvos fluorochromas (tėkmės citometrijoje)

SAPK – „*stress-activated protein kinase*“, tai MAPK pošeimis, kurį sudaro kinazės JNK ir p38

SDS-PAGE – „*sodium dodecylsulphate poly-acrylamide gel electrophoresis*“, baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

SEL – selumetinibas, MEK slopiklis, vaistas

TURINYS

ĮVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	18
1.1. Ląstelių žūtis ir užląsteliniai kontaktai	18
1.2. MAPK	21
1.3. Baltymų kinazė JNK.....	24
1.4. Ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė (ERK).....	25
1.5. AKT molekulė ir signalo perdavimas.....	28
1.6. Atsparumas vaistams ir to priežastys.....	31
1.7. Taikinių terapija.....	35
1.8. Kombinuotas AKT/ERK slopinimas	40
1.9. Plaučių vėžys ir įprasti vaistai	44
1.9.1. Cisplatina	45
1.9.2. Paklitakselis	47
1.9.3. Docetakselis.....	47
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	49
2.1. Medžiagos.....	49
2.2. Tyrimams naudota aparatūra	52
2.3. Metodai.....	53
2.3.1. Ląstelių linijos ir kultivavimas	53
2.3.2. Tėkmės citometrija	54
2.3.3. Gyvybingų ląstelių kiekio nustatymas MTT metodu /ALAMAR blue metodu.....	54
2.3.4. Ląstelių žūties nustatymas fluorescenciniais dažais	55
2.3.5. Ląstelių lizavimas	56
2.3.6. Branduolių išskyrimas ir lizavimas.....	56
2.3.7. SDS-PAGE elektroforezė	56
2.3.8. Imunoblotingo (<i>Western Blot</i>) metodas	57
2.3.9. Imunofluorescencinis metodas.....	57
2.3.10. Konfokalinė mikroskopija.....	58
2.3.11. Kiekybinės PGR metodas	58
2.3.12. Densitometrinė analizė.....	59
2.3.13. Statistinė analizė	59
3. REZULTATAI.....	60
3.1. Užląstelinių kontaktų įtaka signalinių molekulių AKT, MAPK (ERK, JNK, p38), taip pat transkripcijos veiksnio cJun aktyvacijai skirtinguose ląstelių <i>in vitro</i> modeliuose	60

3.2. MAPK ir AKT signalinių kelių molekulių, kaip galimų taikinių plaučių vėžio terapijoje, tyrimas	83
4. REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA	103
IŠVADOS.....	111
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	112
PRIEDAI	133
DISERTANTO GYVENIMO, MOKSLINĖS IR KŪRYBINĖS VEIKLOS APRAŠYMAS	140
SANTRAUKA	150
PADĖKA.....	200
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	201

ĮVADAS

Vėžiniai susirgimai yra viena iš labiausiai paplitusių ligų visame pasaulyje, todėl priešvėžinių vaistų efektyvumas ir vėžio atsparumas chemoterapijai yra labai opios problemos. Vėžys – tai ir genetinis, ir ląstelinis susirgimas, o jo kaip ligos įvairovė yra begalinė, todėl moksliniai vėžio tyrimai išlieka iššūkis ne tik biocheminiame, bet ir ląsteliniame lygmenyje. Individualizuota terapija, besiremianti nustatytais biožymenimis, yra labai brangi ir dėl daugelio priežasčių dažnai neveiksminga. Viena iš perspektyvių kryptių proveržiui – mažamolekuliai junginiai, savitai sąveikaujantys su konkrečiomis viduląstelinius signalus perduodančiomis molekulėmis. Virš 100 baltymų kinazių slopiklių jau yra bandomi klinikiniuose tyrimuose. Prieškilinikiniai (*in vitro*) tyrimai yra būtina šio proceso dalis (Ke et al. 2016)(Niu and Wang 2015).

Vėžys yra liga, kurią sukelia genų, koduojančių ląstelių proliferacijos, apoptozės ir diferenciacijos reguliatorius, pakitimai. Nors finansavimas onkologiniams tyrimams ir gydymui per pastaruosius 30 metų labai išaugo, vėžys sugebėjo aplenkti širdies ir kraujagyslių ligas ir užima pirmą vietą pagal mirtingumą. Vėžio kamieninių ląstelių (CSC) atradimas suteikė vilties, kad pagaliau mokslininkai suprato vėžio esmę ir esminį gydymo taikinį. Tačiau netrukus buvo nustatyta, kad suaugusiųjų kamieninės ląstelės ir vėžio kamieninės ląstelės turi daug daugiau bendra, nei norėtume (Sonnenschein and Soto 2011); be to, normalios kamieninės ląstelės buvo aptiktos arti naviko, dalyvaujančios arba ribojant, ar skatinant jo augimą (Kalvelytė et al. 2017a). Dabartinė vėžio terapijos kryptis – perėjimas nuo nespecifinių citotoksinių vaistų prie racionaliai kuriamų ir į konkrečią molekulę nukreiptų junginių, sąlygojančių didesnę efektyvumą ir mažesnius pašalinius efektus. Tam reikia gerai suprasti vėžio biologiją bei nustatyti ligos „aktyviuosius“ molekulinis taikinius. Tačiau nepaisant pažangios biožymenimis pagrįstos personalizuotos vėžio terapijos, stebimas tik trumpalaikis jos poveikis, o atskiriems pacientams ji visai neveikia. Taipogi, vis dar reikalingi papildomi ir nauji tyrimai, kaip priešvėžiniai vaistai veikia suaugusio organizmo kamienines ląsteles ir kaip galima būtų jas apsaugoti nuo toksinio šalutinio vaistų poveikio.

Plaučių vėžys yra pagrindinė mirčių nuo vėžio priežastis pasaulyje. Nepaisant pasiekimų, tebėra didelis poreikis naujų, inovatyvių gydymo strategijų bei joms atsirasti padedančių priemonių. Tokios priemonės yra plaučių navikų ląstelių linijos, gautos iš ligonių. Šios linijos yra svarbus įrankis tiriant plaučių navikų bazinius išgyvenimo mechanizmus bei naujus priešvėžinius junginius. Parodyta, kad ląstelių linijos *ex vivo* išlaiko tuos

pačius genetinius pakitimus, kaip ir pirminis navikas (Iorio et al. 2016). Plaučių kamieninių bei plaučių vėžio kamieninių ląstelių atradimas pateikia dar vieną reikšmingą priemonę, efektyvinančią taikinių terapijos taikymo tyrimus plaučių vėžiui gydyti (Kajstura et al. 2011a) (Eramo, Haas, and De Maria 2010).

Šiuolaikinės vėžio biologijos ir vėžio gydymo tendencijos daugiausia yra skirtos spręsti atsparumo vaistams problemą. Nauji duomenys rodo, kad šalia onkogeninių persitvarkymų, ne-genetinės atsparumo priežastys lemia vėžio gydymo rezultatus. Ne-mutacinių ląstelių atsparumo mechanizmų supratimas, taip pat nauji jautrumo vaistams tyrimo modeliai turi būti svarbūs ieškant naujų vėžio gydymo būdų.

Nepaisant biožymenimis pagrįstos individualizuotos vėžio terapijos pažangos, daugeliu atvejų buvo nustatytas molekulinio/genetinio profiliavimo nepakankamumas ieškant veiksmingų vaistų kombinacijų. Naujos ataskaitos rodo, kad priešvėžinio gydymo sėkmę paprastai riboja naviko heterogeniškumas, kurio neatskleidžia esami vėžio biožymenimis pagrįsti metodai. Ląstelių heterogeniškumas, ne tik genetinis, bet ir fenotipinis, laikomas pagrindine atsparumo priešvėžiniam gydymui, vėžio progresavimo ir vėžio kamieninių ląstelių išlikimo priežastimi (Jong, Chan, and Nedelcu 2019a). Todėl norint nustatyti veiksmingus vaistų derinius, reikia atlikti gyvų ląstelių, atstovaujančių įvairiems naviką sudarančių ląstelių tipams, funkcinius tyrimus.

Programuotos ląstelių žūties signalo perdavimo tinklų supratimas paveikus priešvėžiniais vaistais yra esminis būdas nustatyti naujus vaistų taikinius ir biologinius žymenis vėžio terapijoje. Yra daug tyrimų, kurie analizuoja molekulinis skirtumus tarp sveikų ir vėžinių, tarp jautrių ir atsparių, tarp kontrolinių ir paveiktų ląstelių. Manipuliacijos chemoterapinių vaistų sukeltais signalais yra perspektyvi tikslingo vėžio gydymo strategija.

Ląstelių likimą reguliuojančių signalinių molekulių aktyvumas yra svarbus veiksnys, lemiantis ląstelių elgseną, taip pat jų atsaką į gydymą, priklausomai nuo ląstelės fenotipinės būklės ir vietos organizme. Ląstelių likimą lemia tiek išgyvenimo, tiek mirties signalai, kurių vaidmenys gali būti skirtingi priklausomai nuo ląstelės tipo, vystymosi stadijos ir stimuliacijos pobūdžio. Ieškant naujų vaistų taikinių ir biologinių žymenų vėžio terapijoje, labai svarbu suprasti ląstelių mirties signalizacijos tinklus, susijusius su gydymu priešvėžiniais vaistais. Signalą perduodančių baltymų kinazių fosforilinimą ląstelėje, kai jos neveikiamos vaistais ir slopikliais, šiame darbe vadinsime baziniu fosforilinimu.

Ryšį tarp ląstelės būsenos ir terapinio jautrumo, o tuo pačiu metu ir ląstelių likimą, apsprendžia signalinių kelių, tarp jų kinazių MAPK ir

PI3K/AKT, aktyvumas, įtakojamas tiek vidinių, tiek išorinių šaltinių. ERK ir AKT perduoda išorinius ir vidinius signalus nuo augimo veiksnių, viduląstelinio streso (tame tarpe DNR pažeidimų), tarpląstelių kontaktų, taip pat adhezijos signalus. Šie signaliniai keliai laikomi pagrindiniais onkogeninių signalų tarpininkais (aktyvuotos ERK ir AKT signalinio kelio molekulės dažnai aptinkamos daugelyje žmogaus vėžio atvejų). Žinomos mutacijos ir paties signalinio kelio genuose. MAPK ir AKT taip pat tarpininkauja ląstelių atsakui į priešvėžinius vaistus. Šių kinazių signalų dereguliacija dažnai siejama su atsparumu gydymui.

Todėl MAPK ir AKT kinazės yra patrauklūs taikiniai, siekiant pagerinti taikininės ar įprastinės chemoterapijos veiksmingumą. Atitinkamai, šių dviejų pagrindinių signalizacijos kelių slopinimas buvo naujai pasiūlytas kaip perspektyvus ir alternatyvus gydymas ir plaučių vėžio atveju (Jain et al. 2021).

Taikininė vėžio terapija, kai prieš gydymą iširiamas paciento mėginys ieškant konkrečių genų mutacijų, taikoma jau daugiau nei 20 metų (imatinibas FDA patvirtintas vėžio gydymui 2001 metais) (L. Zhong et al. 2021). Deja, vėžinės ląstelės randa įvairių kelių įgyti atsparumą. Mes laikomės požiūrio, jog nepaisant to, kad vėžio atsiradimo priežastys yra genetinės, mechanizmai, dėl kurių ląstelė įgyja atsparumą mirties induktoriams, gali būti aktyvuoti negenetinių priežasčių ir priklausyti nuo jos būsenos, diferenciacijos stadijos ir kitų ląstelės mikroaplinkos sukeltų persitvarkymų.

Disertacinis darbas skirtas įvertinti ląstelių žūtį-išgyvenimą reguliuojančių signalinių molekulių modifikacijas, jų sąveikas bei vaidmenį skirtingos būsenos ląstelėse, netekus užląstelių kontaktų bei paveikus įprastais ar taikininiais priešvėžiniais vaistais, jų deriniais. Tyrimuose naudojome komercinės plaučių adenokarcinomos A549 bei ex vivo pirminių plaučių vėžio linijų, gautų iš pacientų, ląsteles. Kaip kontrolines, sveikas ląsteles, palyginimui naudojome triušio raumens kamieninių ląstelių liniją Myo, išvestą mūsų laboratorijoje ir apibūdintą bei aprašytą ankstesniuose mūsų straipsniuose.

Šiame darbe įprasto chemoterapinio vaisto cisplatinos (cis-diamino dichloro platina II) ir taikininė vaistų, parinktų slopinti viduląstelinį signalą perduodančias baltymų kinazes, efektyvumas tirtas ląsteles paveikus vienu vaistu ar įvairiais jų deriniais. Vertinant vaisto veiksmingumą, norėta atkreipti dėmesį į tarpląstelinius kontaktus, vaisto poveikio molekulinis mechanizmus.

Disertaciniame darbe buvo tiriamas bazinis, nuo užląstelių kontaktų priklausomas, bei priešvėžinių vaistų indukuotas signalinių molekulių aktyvinimas, taip pat signalo pobūdis (ląstelės susinaikinimo ar apsauginis), ryšiai tarp signalinių molekulių. Tyrimai, modeliuojant užląstelines sąveikas,

buvo atliekami ląstelėms esant skirtingose būsenose – tai prilipusios (2D), ląstelės agregatuose (3D), ir pavienės ląstelės suspensijoje (0D).

Bazinis signalinių molekulių aktyvumas yra svarbus veiksnys, lemiantis ląstelės elgesį įvairiomis aplinkybėmis. Jo kitimas gali lemti skirtingus atsakus kintančiose sąlygose. Ląstelių kultūrų, kaip gamybos ar mokslinių tyrimų ir tiksliosios medicinos priemonių, naudojimas nuolat auga. Kartu vis dažniau patvirtinamas ląstelės-ląstelės arba ląstelės-substrato kontaktų vaidmuo ląstelės funkcionavimui.

Fundamentiniu ir klinikiu požiūriu labai aktuali sritis – užląstelių kontaktų svarba cirkuliuojančiose (kraujyje ar limfoje) vėžinėse ląstelėse, pavienėse arba agregatuose (klasteriuose). Vėžinės ląstelės dažnai praranda sąveiką su substratu dėl savo ypatybės metastazuoti. Nors cirkuliuojančių navikinių ląstelių klasteriai aprašyti jau seniai, tik dabar į juos pradėta žiūrėti kaip į pagrindinius metastazių plitimo dalyvius. Vėžinių ląstelių sankaupos, homotipinės monokloninės arba polikloninės, atsiskyrusios nuo pirminės naviko vietos ir keliaudamos nedideliais agregatais sudaro naujus židinius toli nuo pirminio naviko esančiose vietose. Vis daugiau tyrimų rodo, kad cirkuliuojantys navikinių ląstelių klasteriai, palaikydami savyje ląstelių sukibimą, geriau nei pavienės ląstelės priešinasi *anoikis* indukcijai (Thangavel et al. 2019)(Amintas et al. 2020)(Ring et al. 2023). Tai gali būti susiję su padidinta antiapoptozinių bei sumažėjusia proapoptozinių genų raiška. Šiuo atžvilgiu, be abejo, molekulinis atskirų ląstelių ir ląstelių grupių apibūdinimas ir palyginimas turi didelę klinikinę reikšmę.

Kitas svarbus tarpląstelių kontaktų vaidmuo yra jų dalyvavimas reguliuojant ląstelių atsparumą terapiniam gydymui. Ląstelė-ląstelė bei ląstelė-substratas kontaktai atlieka svarbų vaidmenį nusprendžiant ląstelių likimą priešvėžinės terapijos metu. Cirkuliuojančios pavienės ląstelės, jų agregatai, ląstelės „kietame“ audinyje gali skirtingai reaguoti į vaistus.

Taip pat svarbu, kad ląstelės, sudarančios 3D kultūras ir (arba) sferoidus, nepriklausomai nuo to, kur jos naudojamos – audinių inžinerijoje, vaistų tyrimuose ir bandymuose, kuriant ląstelinis biojutiklius – sąveikauja tarpusavyje arba su matrica, ir dėl šios sąveikos keičiasi jų savybės. Šiose 3D struktūrose fiziniai ląstelių ryšiai inicijuoja nuo sukibimo priklausomus signalinius kelius, susijusius su daugelio ląstelių funkcijų reguliavimu.

Vis dažniau kalbama, kad tiek pradinį, tiek įgytą vėžio ląstelių atsparumą gydymui lemia ne naviko genotipas, o naviko fenotipas, ir kad jį daugiausia sąlygoja naviko mikroaplinka. Sudėtingi negenetiniai mechanizmai – tokie kaip epigenetika, potransliacinės modifikacijos, signalų ir metabolizmo pokyčiai, ląstelės ciklas ir diferenciacija, jų plastiškumas, taip pat naviko mikroaplinkos ląsteliniai ir neląsteliniai komponentai – lemia ląstelių fenotipą

ir naviko ląstelių heterogeniškumą, o kartu ir atsparumą gydymui (Stulpinas et al. 2020)(Swayden, Iovanna, and Soubeyran 2018)(Jong, Chan, and Nedelcu 2019b)(Wilschut, Haagsman, and Roelen 2010)(Hahn, Bader, Braun, Califano, Clemons, Yoda, et al. 2021). Yra žinoma, kad ląstelių fenotipas labai priklauso nuo mikroaplinkos, daugiausia nuo užląstelinų kontaktų. Reaguojant į aplinkos pokyčius, keičiasi ir ląstelių metabolizmas, ir signalinių molekulių aktyvumas, ir transkripcijos veiksmų raiška. Šie viduląsteliniai pokyčiai prisideda prie daugelio ląstelių funkcijų, tokių kaip išgyvenimas, augimas ir diferenciacija, reguliavimo. Tokiu būdu ląstelių kontaktai per transmembraninius prilipimo receptorius, kadherinų ir integrinų tarpininkaujamus signalinius kelius dalyvauja apsprendžiant ląstelės tipui būdingas funkcijas, įskaitant ir mirties signalų slopinimą.

Šiuo metu daug dėmesio skiriama naujoms priemonėms, skirtoms onkologiniams vaistams kurti ir išbandyti. Įvairūs tyrimai yra orientuoti į kliniškai svarbių ląstelinų modelių kūrimą, kad juos būtų galima naudoti tiksliojoje medicinoje prognozuojant pacientų atsaką į priešvėžinį gydymą, ir vaistams nuo vėžio kurti bei tikrinti ikiklinikiniuose bandymuose (Niu and Wang 2015). Vėžio tyrimuose 3D ląstelių kultūros yra novatoriškas metodas, leidžiantis įtraukti ir kontroliuoti įvairius naviko mikroaplinkos komponentus, apimantis daugybę skirtingų metodų, kuriais galima įvairiai manipuliuoti. Populiariausi metodai yra sferoidai, organoidai, karkasai ir mikroskystinės sistemos. 3D kultūros ir ko-kultūros yra svarbios atliekant ląstelių sąveikos tyrimus. 3D kultūrų, tame tarpe *ex vivo* struktūrų, matricų ar karkasų, panaudojimas fundamentiniams tyrimams ar biotechnologiniuose procesuose leidžia gan gerai pamėgdžioti natūralią ląstelių tarpusavio sąveiką ir mikroaplinką (Hickman et al. 2014)(Derda et al. 2009)(Tomás-Bort et al. 2020).

Ląstelės, sudarančios 3D kultūras ir (arba) sferoidus, nepriklausomai nuo to, kur jos naudojamos – audinių inžinerijoje, vaistų tyrimuose ir bandymuose, kuriant ląstelinius biojutiklius – sąveikauja tarpusavyje arba su matrica, ir dėl šios sąveikos keičiasi jų savybės. Šiose 3D struktūrose fiziniai ląstelių ryšiai inicijuoja nuo sukibimo priklausomus signalinius kelius, susijusius su daugelio ląstelių funkcijų reguliavimu. Tačiau egzistuoja ir tam tikri 3D ląstelių kultūrų taikymo apribojimai, pvz. dėl nepakankamos normaliam ląstelių funkcionavimui reikalingų molekulių (deguonies, maistingųjų medžiagų, metabolitų ir signalinių molekulių) difuzijos (Ravi et al. 2015)(Lv et al. 2017).

Savo tyrimuose naudojome rinkinį taikinių, į MAPK ir AKT signalinių kelių molekules nukreiptų, vaistų, kurie yra įvairiuose klinikinių tyrimų ir FDA patvirtinimo etapuose. Atliekant signalo perdavimo molekulių tyrimus,

ląstelėse siekta nustatyti taikinių ir kitų signalinių molekulių raišką, fosforilinimą, lokalizaciją, taip pat pasirinktų signalą perduodančių molekulių tarpusavio ryšį, reaguojant į užląstelinius kontaktus bei poveikį vaistais. Mūsų tyrimų ašis – MAP kinazės ERK, JNK ir AKT, šias kinazes veikiantys vaistai, bei jų deriniai su įprastiniais chemoterapiniais vaistais. Tai į ERK ir AKT signalinius kelius nukreipti slopikliai (ERK inhibitorius SCH772984, MEK slopikliai trametinibas ir selumetinibas, AKT slopiklis kapivasertibas, AKT inhibitor VIII, PI3K slopiklis idelalisibas) bei plaučių vėžiui gydyti naudojamas vaistas cisplatina. Darbe charakterizuotas taikinių vaistų efektyvumas *in vitro* (taikinio modifikacijos, įtaka proliferacijai/gyvybingumui, konvencinių vaistų sukeltai žūčiai). Alternatyvios kinazės aktyvinimas ląstelėse jas paveikus taikiniais vaistais buvo tiriamas kaip galimas atsparumo taikininei terapijai mechanizmas.

Šiame darbe nemažai dėmesio skyrėme ląstelėms, neturinčioms užląstelinių kontaktų. Jas palaikant suspensijoje buvo imituojama „nesvarumo“ būseną, kurioje dalį laiko praleidžia cirkuliuojančios/metastazuojančios vėžinės ląstelės. Tyrimai tokiam modelyje leidžia atskirai pažvelgti į neprisitvirtinusių (pavienių arba 3D sancaupose esančių) ląstelių signalines molekules bei jų vaidmenį atsakant į priešvėžinį gydymą. Tokių tyrimų pasaulyje nėra daug.

Darbo tikslas

Nustatyti tarpląstelinių sąveikų bei kontaktų su paviršiumi įtaką kinazėms MAPK ir AKT, bei patvirtinti šių signalinių kelių tarpusavio sąveikos reikšmę plaučių vėžio ląstelių modeliuose.

Darbe sprendžiami uždaviniai

1. Nustatyti užląstelinių kontaktų įtaką baziniam MAPK ir AKT fosforilinimui ir raiškai, bei šių kinazių vaidmenį plaučių vėžio ir raumens kilmės ląstelių modeliuose.
2. Įvertinti MAPK JNK signalinio kelio molekulių – kinazės JNK ir transkripcijos veiksnio cJun – priklausomumą nuo **ląstelė-ląstelė** kontaktų tiriamose plaučių vėžio ir raumens kilmės ląstelių linijose.
3. Įvertinti taikinių vaistų, nukreiptų į MAPK ERK ir AKT signalinių kelių molekules, ir jų derinio su priešvėžiniu vaistu cisplatina, poveikį plaučių vėžio kilmės ląstelių gyvybingumui bei molekuliniais vaistų taikiniams.

4. Nustatyti kinazių ERK ir AKT signalinių kelių sąveikos pobūdį skirtingose plaučių vėžio kilmės ląstelių linijose.
5. Įvertinti sąveikos tarp ERK ir AKT kinazių signalinių kelių priklausomumą nuo užląstelinių kontaktų ir priešvėžinio vaisto cisplatinos poveikio stiprumo.

Naujumas ir aktualumas

Šiuolaikinės vėžio biologijos ir vėžio gydymo tendencijos paprastai yra skirtos spręsti atsparumo vaistams problemą. Žinoma, kad vėžys atsiranda dėl mutacijų genuose, kurie atsakingi už onkogeninę transformaciją. Pacientų genetinis profiliavimas tapo įprasta procedūra parenkant gydymą. Tačiau vis daugiau duomenų randasi apie tai, kad atsparumas yra sąlygojamas ir negenetinių veiksnių. Vis labiau pripažįstama, kad ne tik genetiniai pakitimai, bet ir negenetiniai mechanizmai yra susiję su atsparumu vaistams, taip pat su naviko progresavimu. Vėžio ląstelės gali įgyti atsparius fenotipus per epigenetines modifikacijas, signalo perdavimo ir kitų negenetinių mechanizmų pokyčius, priklausomai nuo užląstelinių ir tarpląstelinių veiksnių, susijusių su naviko mikroaplinka. Į ląstelės būseną orientuota terapija tampa viena iš esminių šiuolaikinio vėžio gydymo krypčių.

Nemutacinių atsparumo mechanizmų supratimas, taip pat nauji jautrumo vaistams tyrimo modeliai yra svarbūs ieškant geresnių vėžio gydymo būdų. Vis daugiau duomenų rodo, kad trimačiai (3D) vėžio modeliai turi didelį potencialą gilinant mūsų supratimą apie vėžio biologiją, kuri istoriškai buvo tirama naviko ląstelių kultūrose ant plastikinių plokštelių standaus paviršiaus. 3D *ex vivo* modeliai jau pakeičia esamas *in vitro* sistemas, jos naudojamos vertinant standartinio bei taikininio gydymo veiksmingumą. Skirtingų ląstelių būsenų modeliai gali skirtis ląstelių likimą lemiančių signalinių molekulių aktyvumu, signalo perdavimo kelių reguliacija.

Šiame darbe dėmesys sutelktas į negenetinius ląstelių atsako į priešvėžinį gydymą ir atsparumo terapijai mechanizmus. Skirtingų pacientų ląstelėse, neištyrus ir nežinant jose esančių onkogeninių pakitimų, buvo ieškoma signalinių įvykių, jų sekos ir priežastingumo, lemiančių ląstelės žuvimą arba atsparumą poveikiui.

Tyrime, modeliuojant skirtingas ląstelių būsenas, buvo nagrinėta užląstelinių kontaktų įtaka signalinių molekulių Akt, MAPK (ERK, JNK, p38), taip pat transkripcijos faktoriaus cJun aktyvacijai skirtingose ląstelių *in vitro* sistemose (plaučių adenokarcinomos A549 ląstelių linija, pirminės plaučių vėžio ląstelių linijos, raumenų kilmės kamieninių ląstelių linija). Parodyta, kad nepriklausomai nuo ląstelės kilmės ar ląstelių tipo, tirtų

proteinkinazių bazinis fosforilinimo lygis priklauso nuo užląstelinių kontaktų, nors ir skirtingai tarp atskirų kinazių bei ląstelių tipų. Taip pat svarbu, kad to paties JNK signalinio kelio molekulių aktyvinimas (fosforilinimas ir raiška) priešingai priklausė nuo tarpląstelinių kontaktų.

Apibendrinant, šiame tyrime baltymų kinazių fosforilinimo profilio palyginimas skirtingose ląstelių būsenose – pavienėse, prilipusiose arba agregavusiose ląstelėse – išryškino užląstelinės aplinkos svarbą ir parodė skirtumus tarp ląstelių linijų. Ląstelių likimą reguliuojančių baltymų kinazių priklausomumas nuo užląstelinių kontaktų tuo pačiu rodo, kad ląstelių reguliacija priklauso nuo konteksto, kuriame yra ląstelės. Apskritai galima teigti, kad ląstelių adhezija (prie kitų ląstelių arba substrato), be kitų gerai žinomų vystymosi signalų, yra svarbus veiksnys apsprendžiant ląstelių likimą.

Žinios apie bazinį signalinių molekulių aktyvumą yra svarbios numatant ląstelių reakciją į besikeičiančias sąlygas ir taip prognozuojant ląstelių elgseną biotechnologinių ir biomedicininų procesų metu. Išaiškinimas tarpląstelinių kontaktų įtakos ląstelių likimą reguliuojančių kinazių aktyvacijai /išaktyvinimui yra taip pat svarbus prognozuojant vėžio ląstelių atsaką į priešvėžinį gydymą. Tyrimai, besiremiantys ląstelių būseną bei jų vieta organizme (kietame audinyje ar cirkuliuojant skystame) leistų numatyti ir skirtingus poveikius ląstelėms.

Taip pat, šiame darbe, naudodami žmogaus plaučių vėžio kilmės ląstelių modelius, parodėme, kad dviejų ląstelės išgyvenimo signalinių kelių – MEK/ERK1/2 ir PI3K/AKT –neigiamo grįžtamojo ryšio reiškinys yra būdingas visoms tirtoms ląstelių linijoms. Nepaisant ląstelių fenotipo ar genotipo skirtumų, PI3K/AKT kelio slopinimas skatino MAP kinazės ERK aktyvavimą ir, atvirkščiai, MEK/ERK kelio slopinimas didino fosforilintos AKT lygį. Šis reiškinys patvirtintas tiek kontrolinėse, tiek cisplatina paveiktose ląstelėse, taip pat naudojant skirtingus šių kinazių slopiklius. Nors yra manoma, kad tokia sąveika yra specifinė ląstelių rūšiai ir/arba priklauso nuo konkretaus onkogeninio pakitimo ląstelėje, tyrimų rezultatai leidžia manyti, kad alternatyvios kinazės aktyvacija kaip atsakas į kitos kinazės slopinimą yra universalus reiškinys. Alternatyvios kinazės aktyvinimas ląstelėse – galimas atsparumo taikininiais vaistams mechanizmas.

Kita vertus, parodėme, kad sąveika tarp ERK ir AKT signalinių kelių priklauso nuo užląstelinių kontaktų – grįžtamas ryšys prarandamas ląstelėms netekus sąveikos su užląsteliniu substratu, taip pat inhibuojant fokalinę adhezijos kinazę FAK jos slopikliu PF573228. Kinazių sąveika gali priklausyti ir nuo chemoterapinio stimulo stiprumo.

Ląstelių likimą reguliuojančių signalinių molekulių aktyvumas yra svarbus veiksnys, lemiantis ląstelių elgesį ir jų atsaką į gydymą, kartu

atsižvelgiant į ląstelių fenotipinę būklę ir vietą organizme. Šis darbas pabrėžia adhezinių ląstelių funkcionavimo bei atsako į taikinius vaistus priklausomumą nuo ląstelių būsenos, ir siūlo skirtingas molekulinio poveikio strategijas skirtingų būsenų ląstelėms: kontaktuojančioms (navike) ir cirkuliuojančioms. Manome, kad darbe pateiktos išvados gali būti svarbios individualizuoto vėžio gydymo ir atsparumo vaistams problemoms spręsti.

Ginami teiginiai

- Plaučių vėžio kilmės ląstelėse MAPK bei AKT kinazių bazinis fosforilinimas, nors ir skirtingai tarp atskirų kinazių bei ląstelių linijų, priklauso nuo užląstelių kontaktų, t. y. jis pakinta, ląstelėms atkibus arba prikibus.
- Vieno ir to paties JNK signalinio kelio molekulių, kinazės JNK ir transkripcijos veiksnio cJun, aktyvinimas (fosforilinimas ir raiška) skirtingai priklauso nuo tarpląstelių (ląstelė-ląstelė) kontaktų.
- Plaučių vėžio kilmės ląstelės skirtingai jautrios taikiniams vaistams, slopinantiems MAPK ERK ir AKT signalinių kelių molekules, bei jų deriniams su įprastiniu vaistu cisplatina.
- Visose tirtose plaučių vėžio kilmės skirtingų linijų ląstelėse egzistuoja ERK-AKT signalinių kelių negatyvi kryžminė sąveika.
- ERK-AKT signalinių kelių sąveika priklauso nuo užląstelių kontaktų ir chemoterapinio poveikio stiprumo.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Ląstelių žūtis ir užląsteliniai kontaktai

Ląstelių žūties reguliavimas yra toks pat sudėtingas kaip ląstelių dalijimosi ar diferenciacijos. Embriono vystymosi ir audinių atsinaujinimo fiziologiniame kontekste, arba kaip patologinis atsakas į ląstelių sužeidimus ir infekcinius patogenus, ląstelių žūtis vyksta dėl organizmui naudingų tikslų. Tai apima epitelio barjerinės funkcijos palaikymą, mikrobu sunaikinimą, adaptyvų imuninį atsaką, biologinių makromolekulių perdirbimą, tarpląstelinį signalo perdavimą ir genomo vientisumo išsaugojimą (Danial and Hockenbery 2018).

Ląstelių žūtis yra skirstoma į dvi atskiras kategorijas: atsitiktinę ląstelių žūtį ir reguliuojamą ląstelių žūtį. Dėl stiprių mechaninių, fizinių ar cheminių veiksnių, tokių kaip, traumos, aukšta temperatūra, pH, ląsteles ištinka netikėta, atsitiktinė ląstelių žūtis. Reguluojama ląstelių žūtis reiškia kelis genetiškai užkoduotus kelius, kurie reikalingi siekiant išlaikyti ląstelių homeostazę. Reguluojama ląstelių žūtis apima potipį, vadinamą užprogramuota ląstelių žūtimi (Kim-Campbell, Gomez, and Bayir 2019). Nors vyrauja požiūris, kad konkreti mirties programa yra reguliuojama gan apibrėžtai, procesų molekulinė įvairovė ir sudėtingumas vis dar neleidžia išbaigti šio klausimo. Istoriskai, nekrozė ir apoptozė buvo dvi pagrindinės ląstelių mirties rūšys, tačiau vystantis mokslui buvo atrasta daug kitų ląstelės žūties būdų, kaip antai ferroptozė, piroptozė, netozė, ar nuo autofagijos priklausoma ląstelių žūtis, ir dar dešimt kitų (Stulpinas and Kalvelytė 2019). Tačiau alternatyvios ląstelės žūties tipų nomenklatūros kūrėjai teigia, kad egzistuoja tik keturi iš esmės skirtingi pavienių ląstelių žuvimo tipai: apoptozė, senatvinė mirtis, streso sukelta žūtis, ir nekrozė (X. Liu et al. 2018). Ir jie, su savo argumentacija ir kompetencija, yra teisūs.

Glaustai, apoptozinė ląstelių žūtis charakterizuojama chromatino kondensacija, internukleosomine DNR fragmentacija ir cisteino proteazių (kaspazių) aktyvacija. Laikoma, kad apoptozę inicijuoja išoriniai mirties receptoriai (tokie kaip FAS) arba citochromo c baltymas, patekęs į citoplazmą iš mitochondrijų.

Ląstelinės sąveikos, kurios skiriasi audinyje *in vivo*, monosluoksnyje ar ant 3D paviršiaus *in vitro*, yra gyvybiškai svarbios ir apsprendžia ląstelių išgyvenimą, proliferaciją, kitas sudėtingas funkcijas. Paprastai, normalios prilipusios ląstelės, kurios praranda kontaktą su užląsteline matrica (ECM), netrukus patiria *anoikis* (apoptozinę mirties formą, nuo graikiško žodžio „benamis“). *Anoikis* yra užprogramuotos ląstelių mirties forma, kurią vykdo

nuo kaspazės priklausomi vidiniai ir išoriniai apoptozinį signalą perduodantys keliai. Tai normalus fiziologinis procesas, užtikrinantis audinių regeneraciją ir homeostazę.

Šio mechanizmo tyrimai yra svarbūs terapiniu požiūriu, nes kamieninių ląstelių transplantacijoje susiduriama su persodintų ląstelių žūties problema, būtent dėl kontakto su jų gimtaisiais paviršiais praradimo. Masinė ląstelių mirtis, be išemijos ir uždegiminių procesų, lemia ląstelių terapijos nesėkmę gydant pvz. infarkto pažeistą širdies raumenį (Robey et al. 2008). Išorinės sąveikos nebuvimas (atkibimas) inicijuoja signalinius kelius, vedančius į ląstelių mirtį, slopinant antiapopozines ir (arba) suaktyvinant proapopozines molekules (Vachon 2011). Skirtingai nuo įprastų organizmo ląstelių, vėžinė ląstelė, vaizdžiai tariant, savo poreikius iškelia aukščiau viso organizmo poreikių, todėl blokuoja mechanizmus, kurie neleidžia išgyventi be sąlyčio su substratu, todėl gali nukeliauti į tolimesnes kūno vietas, taip suformuodamos naujus piktybinių ląstelių židinius (Paoli, Giannoni, and Chiarugi 2013). Atsparumo *anoikis* indukcijai tyrimai pastaruoju metu suintensyvėjo, nes tai – niša naujo pobūdžio priešvėžinei terapijai. Viena iš naujai atrastų šio reiškinio priežasčių – suapvalėjusios ląstelės paviršiaus išlinkimai, kuriuose gausu antiapoptozinių molekulių kompleksų (Weems et al. 2023).

Abiejų tipų sąveikos (arba su ECM, arba su kita ląstele) vyksta per ląstelių prilipimo/sukibimo molekules (integrinus, kadherinus, selektinų šeimos baltymus ir pan.). Būdamos transmembraninės, šios molekulės veikia kaip ligandų receptoriai ląstelės išorėje, o viduje dalyvauja formuojant sudėtingus signalinių molekulių kompleksus, taip reguliuojant jų aktyvumą (X. Zhong and Rescorla 2012).

Ląstelių funkcijų reguliavimas dėl ląstelė-ląstelė ir ląstelė-ECM sąveikos nėra iki galo suprastas ir todėl yra aktyviai tiriamas, įskaitant *anoikis* mechanizmus. Nenuostabu, kad vienu metu publikuoti du nepriklausomi tyrimai apie su *anoikis* susijusius genus ir jų reikšmę plaučių adenokarcinomos prognozei pateikė labai skirtingus rezultatus (Diao, Guo, and Li 2023) (Zhou and Hu 2023; doi: 10.3389/fcell.2023.1125782). Nors normalios kamieninės ir vėžinės ląstelės turi daug panašių bruožų, iš kurių svarbiausias – neribotas dauginimosi potencialas, normalios kamieninės ląstelės prirėkus lengvai diferencijuojasi į determinuotas ląsteles ir nekelia grėsmės organizmui. Taigi ląstelių sąveikų – tarpusavio kontakto ir sukibimo su substratu – vaidmens išaiškinimas ir išnaudojimas reguliuojant ląstelių funkcionavimą yra svarbu tiek regeneracinėje medicinoje, tiek gydant vėžį.

Ląstelės biologijoje plačiai pripažįstama, kad du pagrindiniai signalizacijos keliai, atsakingi už ląstelės likimą ir kuriuos aktyvuoja paviršiaus receptoriai, yra fosfoinozotido-3 kinazės (PI3K) AKT kelias ir

RAS/RAF/MEK/ERK kelias. PI3K/AKT ir mitogenų aktyvuotos baltymų kinazės (MAPK) keliai yra pagrindiniai ląstelių proliferacijos, taip pat diferenciacijos ir mirties reguliatoriai. Tarpląstelinų kontaktų inicijuota reguliacija taip pat apima aukščiau minėtų baltymų kinazių kaskadas (Steelman et al. 2011). Šiuos kelius aktyvuoja įvairios ir skirtingos onkogeninės mutacijos, būdingos daugeliui vėžio formų. Šios kinazės yra vienos iš kandidatų, galinčių pagerinti taikininės ir įprastinės chemoterapijos veiksmingumą, nes MAPK ir AKT signalizacijos keliai yra pagrindiniai onkogeninių signalų keitikliai naviko ląstelėse, tarpininkauja ląstelėms atsakant į priešvėžinius vaistus ir yra susiję su atsparumu chemoterapijai. Neseniai nustatyta, kad cirkuliuojančių vėžio ląstelių paviršiaus išlinkimuose susikoncentruoja onkogeniniai RAS baltymai, lemiantys PI3K ir ERK aktyvumo padidėjimą, o tuo pačiu ir atsparumą apoptozės indukcijai (Weems et al. 2023).

Pirmajame kelyje, kinazės AKT aktyvinimui reikalingas kinazės PI3K aktyvumas, kurią savo ruožtu netiesiogiai aktyvuoja integrinai, susilietus su ECM baltymais *in vivo*. AKT taip pat gali tiesiogiai fosforilinti ir aktyvuota su integrinu susietos kinazės ILK, kurią stimuliuoja tie patys integrinai. Laikoma, kad AKT tampa aktyvia molekule kai fosforilinama jos S473 ir T308 (Brognard et al. 2001).

Užląstelinio signalo reguliuojama kinazė ERK yra MAP kinazės šeimos, kuri taip pat apima p38 ir cJun N-galinę kinazę (JNK), narys. Šios trys MAP kinazės turi būdingą T-x-Y aminorūgšties motyvą, kurio dvigubas fosforilinimas lemia šių baltymų aktyvavimą. MAPK dalyvauja perduodant ląstelių mirties/išgyvenimo arba proliferacijos signalus, atsirandančius ląstelės paviršiuje. Be to, kas svarbu technologiniuose procesuose, MAPK reguliuoja genų su CMV promotoriumi raišką, kuris dažnai naudojamas žinduolių vektoriuose baltymų biologinei gamybai (Rodova et al. 2013).

Apibendrinant, užląstelinų kontaktų įtakos ląstelių likimą reguliuojančių kinazių aktyvacijai/deaktyvacijai išaiškinimas yra svarbus veiksnys prognozuojant vėžio ląstelių atsaką į priešvėžinį gydymą. Papildomai, tai leistų selektyviai paveikti skirtingas ląsteles pagal jų fenotipinę būklę ir vietą kūne (gyvenančias kietame audinyje arba cirkuliuojančias priešmetastaziniu būdu). Svarbu pažymėti, kad naujos žinios taip pat yra reikalingos siekiant apsaugoti normalias kamienines ląsteles suaugusiame organizme chemoterapijos metu.

1.2. MAPK

Nuo signalo perdavimo atradimo, kai fosforilintas baltymų tirozinas staiga tapo nebe artefaktu, o ląstelei gyvybiškai svarbiu įvykiu, buvo identifikuota daugybė baltymų, pasižyminčių fosforilinimo fermentiniu aktyvumu. Ši fermentų grupė yra vadinama kinazėmis. Kinazės, fosforilinančios kitų baltymų tirozino, serino ir treonino amino rūgštis, traktuojamos kaip perduodančios signalą ir vadinamos signalinėmis kinazėmis. Įdomu tai, kad daugumos tokių kinazių fermentinis aktyvumas atsiranda (arba žymiai sustiprėja) kai jos pačios yra fosforilinos ir įvyksta baltymo konformacijos pasikeitimas iš neaktyvios į aktyvią. Tokiu būdu signalas, ypač užląstelinis, yra perduodamas bent keliomis pakopomis, sudarant fosforilinimo kaskadas.

Tarp tuzino signalinių kaskadų (PKA, PI3K/AKT, PKC, JAK/STAT, NFκB, LYN/SYK, mTOR ir kt.) yra ir užląstelinio signalo reguliuojamų kinazių kelias RAS-RAF-ERK, reguliuojantis ląstelių dalinimąsi, diferenciaciją bei išgyvenimą (atsparumą stresinėms aplinkybėms). Šiam signalo perdavimo keliui priskiriamos baltymų kinazės turi būdingus konservatyvius domenų, pagal kurių homologiją galima atpažinti daugiau kinazių, priklausančių mitogenais aktyvuojamų proteinkinazių (MAPK) superšeimai. Joje, nors ir persipynę, išskiriami 3 pagrindiniai signaliniai keliai: ERK, p38 ir JNK. Kiekvienas iš pastarųjų baltymų turi po keletą izoformų, kurios, kaip parodyta daugybę kartų, gali atlikti bendras arba išskirtines funkcijas. ERK kinazė turi 8 izoformas (nuo ERK1 iki ERK8), p38 – α, β, γ, ir δ izoformas, JNK kinazė – 3 izoformas (JNK1/2/3) (E. K. Kim and Choi 2010). Pz., JNK šeimos baltymus koduoja trys genai (JNK 1/2/3), ir JNK3 raiška registruojama tik keletoje žmogaus audinių, tuo tarpu JNK1 ir JNK2 raiška randama visuose audiniuose. Panaši audiniui būdinga izoformų raiška sutinkama ir p38 šeimoje: 4 genais koduojami baltymai „pasidalinę“ tarp smegenų ir plaučių (beta), skeleto raumenų ir nervų (gama), bei kasos ir gimdos (delta), tuo tarpu p38α baltymas sutinkamas visuose organuose ir audiniuose (Yokota and Wang 2016). P38 ir JNK yra vadinamos streso aktyvuojamomis baltymų kinazėmis (SAPK). Yra žinoma, kad membraniniai ląstelių receptoriai, sąveikaudami su savo ligandais sukelia GDP į GTP pasikeitimą mažo molekulinio svorio GTPazėje Ras, taip ją aktyvuodami, o pastaroji, sudarydama kompleksus su Raf-1, PI3K, Ral baltymais, p120GAP ir p190GAP, per žemiau einančias signalą perduodančias grandis aktyvina visas tris MAP kinazių šeimas (ERK, p38 ir JNK). Nors tai greičiau išimtis nei taisyklė, tačiau yra duomenų, kad galutiniai MAP kinazių taikiniai – genų

raiškos reguliatoriai (Elk-1, ATF-2) – gali būti reguliuojami vienu metu kelių skirtingų MAPK (Wada and Penninger 2004).

MAP kinazių fermentinis aktyvumas yra „įjungiamas“ jas fosforilinant konservatyviame T-X-Y motyve. Šį aktyvinimą atlieka dvigubo savitumo (treonino ir tirozino) aukštesnė MAP kinazė, kitaip vadinama MAPKK. Pastarąsias, savo ruožtu, fosforilina dar aukštesnės kinazės MAPKKK (arba MAP3K), tuo būdu sudarant grandininę trijų lygių fosforilinimo kaskadą, kuri yra signalo perdavimo dalis (A1 pav.).

Antra vertus, nuolatinis fosforilinimas arba aktyvumas nėra būdingas ar reikalingas ląstelėje, todėl MAP kinazių išjungimą atlieka dvigubo savitumo fosfatazės, gražinančios šias signalines molekules į neaktyvią būseną (Patterson et al. 2009). Taigi, fosfato grupės tinkamas prijungimas prie signalinės molekulės arba fosfato nuėmimas bei laiko intervalas, per kurį įvyksta šis ciklinis procesas, yra svarbiausi faktoriai, lemiantys ir užtikrinantys vienokį ar kitokį ląstelių elgesį.

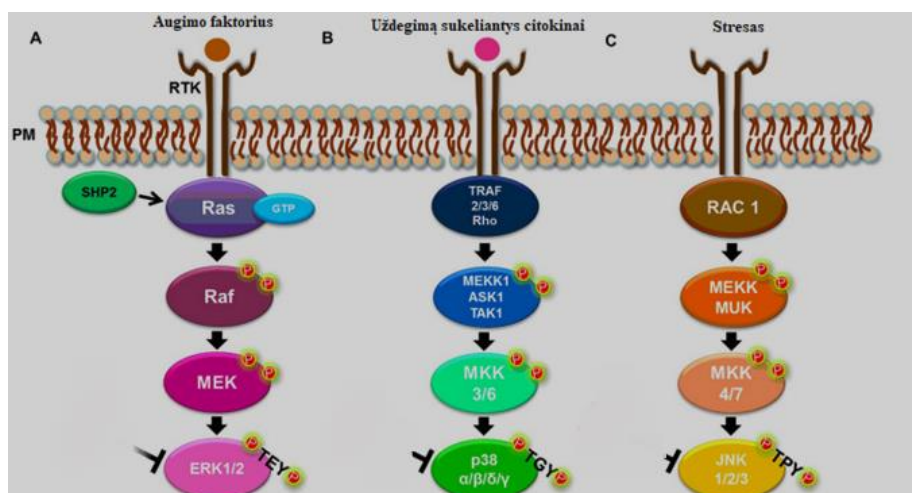
Tačiau MAP kinazių tinklas nėra paprastas ir aiškus ta prasme, kad fosforilinimas arba fosfato nuėmimas lemtų labai konkretų ir tikslų veiksmą ląstelės cikle ar priimant kitokį elgesio sprendimą. Daugybe tyrimų parodyta, kad MAP kinazių aktyvavimas įtakoja tokius ląstelei svarbius ir skirtingus momentus kaip išgyvenimas, apoptozė, diferenciacija, proliferacija ar migracija, todėl ilgainiui buvo išvystyta teorija, kad sprendimus ląstelė priima atsižvelgama į MAP kinazių aktyvinimo trukmę bei stiprumą. Vienas iš hipotetinių šio mechanizmo paaiškinimų (bent jau praeinančiam, trumpalaikiam aktyvinimui) buvo pateiktas remiantis staigaus ankstyvojo atsako genų (*immediate early gene*) produktais, tokiais kaip transkripcijos veiksniai Fos, Jun, Fra, Myc bei Egr-1, kai pvz. neženklus ERK aktyvumo pakitimas labai ženkliai įtakojo šių genų raišką bei jų produktų stabilumą (Murphy, MacKeigan, and Blenis 2004).

Nors atrodytų, kad MAPK kryžminis nesavitumas (gebėjimas vienai kinazei fosforilinti kelis taikinius ir kelioms kinazėms turėti vieną bendrą taikinį) turėtų aktyvinti ne vieną konkretų žemesnį taikinį, o visus įmanomus kinazės taikinius, vis dėlto signalo perdavimas yra labai tikslus ir didele dalimi yra užtikrinamas pastoliniais (*scaffold*) baltymais, kurie, sąveikaudami iš karto su 2 ar daugiau kaskados komponentų, o taip pat ir nešdami lokalizacijos signalines sekas, užtikrina tvarkingą įvykių vietą ir seką (Garrington and Johnson 1999).

MAPK signalinių kelių tyrimai reikalingi ne tik pažinti ląstelių elgesį normaliomis sąlygomis, pvz. organogenezėje ir ląstelių diferenciacijoje, bet taip pat ir suprasti, kaip ir kodėl pasielgs ląstelė reaguodama į stresines aplinkybes, tame tarpe paveikus ląstelę cheminėmis medžiagomis, tokiomis

kaip pvz. vaistai. Tiek dėl padidėjusio vaistų vartojimo visuomenėje, tiek ir dėl padidėjusios aplinkos taršos, o taip pat ir dėl genetinių individualaus žmogaus polinkių/ypatumų, MAP kinazės gali prisidėti prie audinius sudarančių ląstelių fenotipinių pakitimų, kurie ilginiui gali virsti lėtiniais susirgimais. Širdies/kraujagyslių ligos, vėžys, diabetas, neurodegeneratyvai susirgimai, reumatinis artritas – tiek gyvūnų modeliuose, tiek pacientų biopsijų tyrimai yra ne kartą parodę, kad sveikuose (kontroliniuose) organizmuose MAPK fosforilinimas skiriasi nuo to, kuris stebimas patologijų atvejais.

Remiantis aukščiau išvardintais faktais, baltymų fosforilinimo dirbtinas reguliavimas/moduliavimas yra potenciali strategija ląstelių elgesiui manipuluoti.



AI pav. Supaprastinti MAPK signaliniai keliai. (A) ERK1/2 keliai (B) p38 keliai. (C) JNK keliai (Soares-Silva et al. 2016).

Yra žinoma, kad MAPK kaskados perduoda vidinius ar išorinius signalus nuo augimo veiksnių arba tarpląstelių kontaktų, taip pat adhezijos signalus, kad perprogramuotų genų raišką. Galutiniai MAP kinazių taikiniai yra transkripcijos veiksniai ląstelių branduolyje. MAPK reguliuoja esmines ląstelių funkcijas, tokias kaip proliferacija, išgyvenimas, augimas, metabolizmas, migracija ir diferenciacija. Vėžiniuose susirgimuose signalai, kuriuos sukelia mutavę genai, apima įvairių baltymų kinazių aktyvinimą. MAPK ERK signalinio kelio molekulės dažnai aktyvuojamos dėl įvairių onkogeninių mutacijų ir aptinkamos daugelyje žmogaus vėžio atvejų. Žinomi atvejai, kai mutacijos atsiranda pačiame MAPK signaliniame kelyje. Dėsninga tai, kad žemiausiose grandyse, t.y. vaizdžiai tariant arčiau

branduolio, mutacijos labai retos, o pradinėse grandyse – „arčiau“ ląstelės membranos – mutacijos labai dažnos (Yaeger and Corcoran 2019). MAPK (ir AKT) signaliniai keliai laikomi pagrindiniais onkogeninių signalų pernešėjais, ir taip dalyvauja vėžio progresavime. Taip pat, MAPK tarpininkauja ląstelių atsakui į priešvėžinius vaistus. Šių kinazių signalų dereguliacija dažnai siejama su atsparumu gydymui.

1.3. Baltymų kinazė JNK

MAP kinazė JNK yra žinoma kaip atsako į stresą kinazė ir dažnai dalyvauja sukeldama ląstelių žūtį. Žinoma, kad ji dalyvauja reguliuojant pagrindines ląstelės funkcijas, tokias kaip proliferacija ir žūtis. JNK signalinio kelio reguliacijos sutrikimai gali nulemti neurodegeneracinius, širdies ir kraujagyslių sistemas, vėžinius ir kt. susirgimus. Pirmiausia, JNK buvo atrasta kaip kinazė, susijusi su onkogenu cJun, t. y. fosforilanti šį transkripcijos veiksni (iš to ir pavadinimas – „cJun N-terminal kinase“, JNK), tačiau pasirodė, kad JNK aktyvinasi ir apšvietus UV spinduliais (dėl to gavo antrą pavadinimą – streso kinazė). Tokiu būdu kilo įtarimas, kad stresas ir onkogeneze gali būti susiję. Yra duomenų, kad JNK kelias gali dalyvauti žmogaus vėžio atsiradime. Pirmieji plaučių vėžio streso kinazių tyrimai parodė JNK aktyvinimą klinikiniuose pavyzdžiuose. Kiti tyrėjai parodė, kad JNK yra aktyvinta daugiau nei pusėje tirtų nesmulkiąstelinio vėžio biopsijos pavyzdžių, ji dalyvauja žmogaus bronchų epitelinių ląstelių navikinėje transformacijoje (Khatlani et al. 2007). Padidėjęs JNK fosforilimas nesmulkiąstelinio plaučių vėžio atvejais, palyginus su normaliu plaučių audiniu, rodo jo galimą svarbą ankstyvos plaučių vėžio stadijos navikuose bei vaidmenį bronchų epitelio onkogenezeje (Silvestre ir Mercedes, 2004). Iškelta hipotezė, kad JNK gali būti diferencinės diagnostikos biožymeniu, skiriančiu dvi nesmulkiąstelinio plaučių vėžio formas – adenokarcinomą ir plokščialąstelinį plaučių vėžį, o tai yra svarbu gydant ligonius avastinu. JNK streso kinazė yra svarbi plokščialąstelinio vėžio ląstelių diferenciacijoje bei onkogeninėje transformacijoje (B. Liu et al. 2008)(Nitta, Badal, and Wong 2010). JNK, manoma, gali dalyvauti palaikant vėžio kamieninių ląstelių savybes, kamieniškumą (W. Song et al. 2014).

Ir priešingai, JNK1/2 gali slopinti onkogenezę, kas parodyta odoje, žarnyne, krūtyje, prostatoje ir hematologinėje sistemoje. Kaip apžvelgta (S. Lee, Rauch, and Kolch 2020), abiejų JNK1 / 2 pašalinimas hepatocituose paskatino vėžio vystymąsi, nors ir žūvant ląstelėms, tačiau įsijungus kompensacinei išgyvenusių hepatocitų hiperproliferacijai. Be to, priešuždegiminė citokinų gamyba, kurią skatino JNK signalizacija kepenų

imuninėse ląstelėse, prisidėjo prie šio fenotipo, nes palaikė navikui naudingą mikroaplinką. Panašiai, JNK1 ir JNK2 ištrynimai pelių modelyje skatino genetinį nestabilumą ir sukėlė platų naviko vystymąsi. Yra nustatyta, kad JNK gali aktyvuoti autofagijos programą, kad sustabdytų apoptozę, arba inicijuoti dalinimosi programą greta žūtį patiriančios ląstelės (Ryoo and Bergmann 2012). Net gi teigiama, kad JNK1 labiau dalyvauja ląstelės išgyvenimo mechanizmuose, taip pat vėžio skatinime, o JNK2 – apoptozės procese ir vėžio slopinime (Q. Wu et al. 2019). Maža to, JNK aktyviai dalyvauja atsirandant atsparumui vaistams, kai gydoma į RAF (MAPK ERK signalinis kelias) nukreiptais taikininiais vaistais (vemurafenibu, dabrafenibu, encorafenibu), dalinai dėl to, kad ERK ir JNK turi kelis bendrus fosforilinimo taikinius, įskaitant cJun (S. Lee, Rauch, and Kolch 2020).

Taigi, JNK įvairiose ląstelinėse sistemose gali vaidinti skirtingą vaidmenį ir net vykdyti priešingas funkcijas toje pačioje ląstelėje (Q. Wu et al. 2019)(Stulpinas et al. 2021). Todėl, naudojant JNK modulatorius lėtinių ligų terapijoje, manytina, kad svarbu išsiaiškinti skirtingo JNK veikimo mechanizmus bei nustatyti galimus žymenis, leidžiančius prognozuoti JNK vaidmenį ląstelėje. JNK aktyvinimo ir veikimo ląstelėse charakteristikos bei prognostiniai žymenys galėtų būti svarbūs nustatant JNK signalinio kelio molekulių terapinį potencialą, individualizuojant su JNK susijusių ligų gydymą (Q. Wu et al. 2020).

JNK signalinio kelio tyrimai biomedicininėje literatūroje cituojami daugiau negu 20.000 kartų.

1.4. Ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė (ERK)

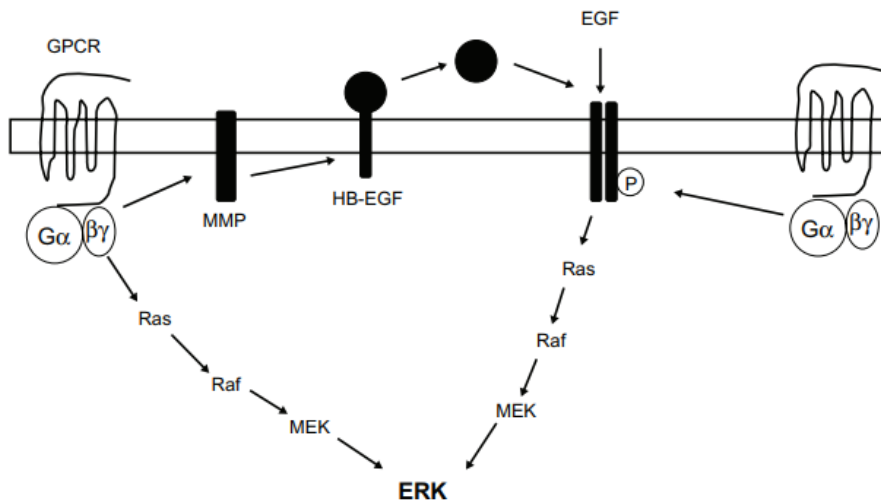
Receptorinės tirozino kinazės (RTK) yra su MAPK keliu susijusios kinazės, esančios ląstelių plazminėje membranoje. Tai transmembraniniai baltymai, išorinėje dalyje sąveikaujantys su specialiais ligandais, o vidinėje dalyje, po ligando prijungimo, fosforilinantys su receptoriumi susijusius kitus baltymus, esančius prieš signalinį kelią. EGFR ir FGFR1 yra vieni iš nedaugelio RTK pavyzdžių. RTK/RAS/RAF/MEK/ERK yra MAP kinazės signalo perdavimo modulis, kuris yra vienas iš labiausiai paplitusių onkogeninių kelių ir yra būdingas daugeliui vėžio formų, lemiančių vėžinių ląstelių transformaciją ir nevaldomą jų augimą (Roskoski 2019a; Najafi, Ahmadi, and Mortezaee 2019).

RAS yra maža GTPazė, kuri tarpininkauja sąveikoje su virš jos ir po ja esančiais baltymais. RAS baltymai yra pritvirtinti prie vidinio plazminės membranos paviršiaus ir veikia kaip jungiklis tarp aktyvaus RAS-GTP ir neaktyvaus RAS-GDP. RAS aktyvavime tarpininkauja RTK. Su GTP surištų

RAS baltymų sąveika su RAF baltymais lemia RAF dimerizaciją ir aktyvaciją. Ankstyvoje onkogenozės stadijoje RAS veikia kaip natūralus barjeras vėžinių ląstelių susidarymui slopinti. Pagrindinės RAS onkogeninės mutacijos būna HRAS gene, NRAS ir KRAS, ir pasireiškia daugelyje vėžio rūšių, įskaitant 70 % kasos latako adenokarcinomą, 40 % storosios žarnos ir 35 % nesmulkią ląstelinį plaučių vėžį (NSCLC; dažniausiai KRAS mutacija). RAF genas koduoja ARAF, BRAF ir CRAF (arba RAF1). RAF aktyvacijai vėžinėse ląstelėse reikalinga RAF dimerizacija, kuriai įvykti padeda su RAS sąveikaujantis domenas ir paties RAS dimerizacija (Najafi, Ahmadi, and Mortezaee 2019). Navikai, sukeliama BRAF mutacijų, apima 90 % odos melanomų, 10 – 70 % skydliaukės vėžio (atsižvelgiant į histologiją), apie 10 % storosios žarnos vėžio ir 4 % NSCLC (Roskoski 2019b).

MEK yra dar viena MAPK signalinio kelio sudedamoji dalis. Šią grupę sudaro dvi kinazės: MEK1 (MAP2K1) ir MEK2 (MAP2K2). MEK aktyvaciją (per fosforilinimą) skatina baltymų kinazės RAF izoformos. Aktyvi MEK fosforilina ir aktyvina ERK1/2.

ERK priklauso MAPK superšeimai ir turi aštuonias izoformas (nuo ERK1 iki ERK8), iš kurių geriausiai ištirtos ERK1 ir ERK2. ERK1 ir ERK2 dalyvauja RAS/RAF/MEK/ERK aktyvacijos mechanizme. Šis mechanizmas reguliuoja įvairius procesus, įskaitant ląstelių sukibimą, ląstelių ciklo progresavimą, ląstelių migraciją, ląstelių išlikimą, diferenciaciją, metabolizmą, proliferaciją ir genų transkripciją (Meister et al. 2013). ERK gali būti aktyvinta stimuliuojant su G baltymais susijusius receptorius (GPCR) arba aktyvuojant augimo faktoriaus stimuliuojamus tirozino kinazės receptorius (RTK). Po GPCR stimuliavimo, ERK gali būti aktyvinama tiesiogiai per RAS/RAF/MEK kaskadą, arba per augimo faktoriaus tirozino kinazės receptoriaus transaktyvinimą, pavyzdžiui EGFR, dalyvaujant metalo proteazei (A2 pav.).

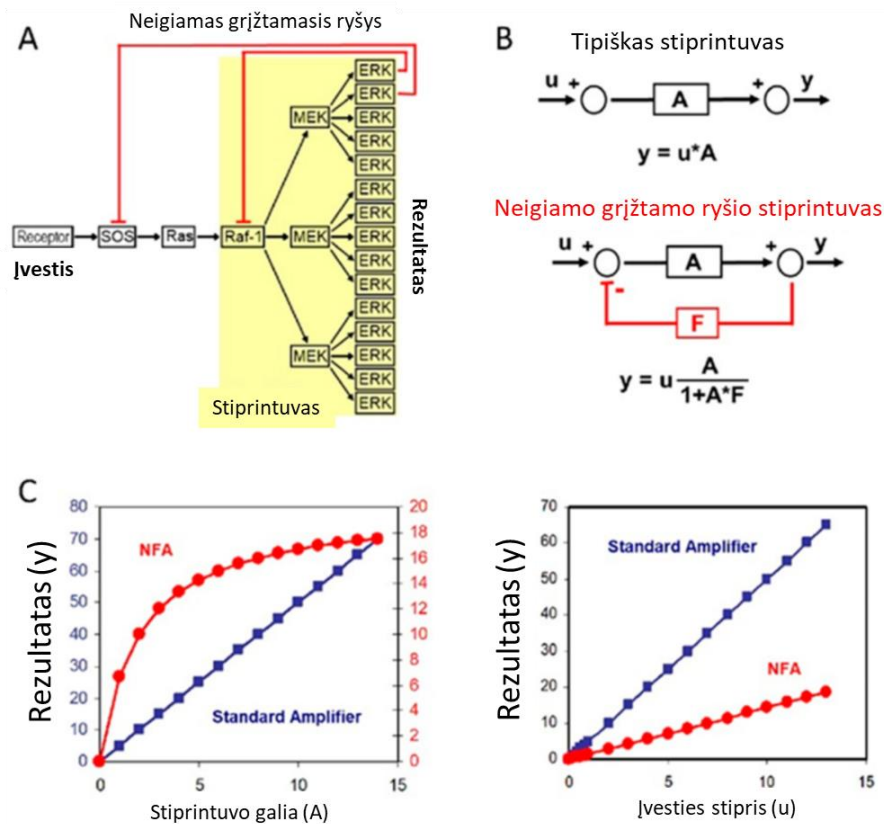


A2 pav. Galimi ERK aktyvinimo mechanizmai. ERK aktyvavimas gali vykti dviem būdais, stimuliuojant GPCR arba EGFR, kurie aktyvuoja RAS/RAF/MEK baltymų kinazių kelią. GPCR suaktyvinimas ne tik tiesiogiai aktyvuoja RAS/RAF/MEK baltymų kinazių kelią, tačiau gali aktyvuoti EGF kelią įjungus MMP ir su membrana susijusio ligando (HB-EGF) išskyrimą, kuris aktyvuoja EGFR (Roberts 2012).

Aktyvinta kinazė ERK gali fosforilinti arba sąveikauti su daugeliu (> 300) citozolinių ir branduolinių substratų, įskaitant vėžio supresorių p53 ir p90 ribosominę S6 kinazę RSK (Maik-Rachline and Seger 2016)(Achkar et al. 2018).

ERK signalinei kaskadai labai svarbi yra ERK molekulių buvimo vieta. Ląstelei esant ramybės būsenoje, ERK yra randamas citoplazmoje, kurioje yra daug inkarinių ir karkaso baltymų, kurie sąveikauja su ERK prijungimo domenais ir neleidžia priartėti citoskeleto elementams, saugo juos nuo organelių paviršiaus ir difuzijos citoplazmoje (Meister et al. 2013).

Svarbu paminėti, kad ERK kelyje yra neigiamas grįžtamasis ryšys (A3 pav.). Didele dalimi dėl to, į RAF ir MEK nukreipti vaistai-slopikliai sukelia paradoksinį ERK kelio aktyvinimą ir nepasiteisina. Priešingai, yra siūloma kai kuriais vėžio atvejais stimuliuoti ERK, kad vėžinės ląstelės žūtų (Kanda et al. 2021).



A3 pav. ERK signalinis kelias veikia kaip neigiamo grįžtamojo ryšio stiprintuvas (NFA). A. Scheminis ERK kelio vaizdas su apytiksliais kelio komponentų, paprastai randamų ląstelėse, stochiometrijomis ir nurodytais neigiamais grįžtamais ryšiais. B. Standartinio stiprintuvo ir NFA palyginimas. Formulė, susiejanti įvestį (u) su išėjimu (y), rodo, kad NFA išvestyje dominuoja grįžtamojo ryšio stiprumas (F), o ne stiprinimas (A). C. Grįžtamo slopinimo modelis rodo, kad ERK kelio signalinio kelio jautrumas didelis, bet stiprumą padidinti yra sudėtinga (S. Lee, Rauch, and Kolch 2020).

ERK1/2 signalinio kelio tyrimai biomedicininėje literatūroje cituojami daugiau negu 30.000 kartų.

1.5. AKT molekulė ir signalo perdavimas

Serino/treonino kinazė AKT yra žinoma kaip baltymų kinazė B (PKB), turinti tris izoformas (AKT1, AKT2 ir AKT3). AKT1 yra pagrindinis fosfolipidų PIP_3 signalinio kelio komponentas. Šiame tinkle PIP_3 lygį kontroliuoja PI3K ir fosfatazė PTEN. AKT1 reguliavime dalyvauja

fosfolipidas PIP₃, kuris perkelia AKT1 į plazminę membraną, kur ją veikia dvi baltymų kinazės – mTORC2 ir PDK1, kurios fosforilina AKT1 atitinkamai C gale (Ser473) ir aktyvacijos kilpoje (Thr308). Dvigubas AKT1 fosforilinimas lemia padidėjusį AKT kinazės aktyvumą, nukreiptą į baltymų substratus, įskaitant GSK3, mTOR ir FOXO1/3a. AKT aktyvumas gali skatinti ląstelių augimą, blokuoti apoptozę ir tarpininkauti insulino atsake (Chu et al. 2018).

Nenormalus fosfatidilinozitol-3-kinazės (PI3K) aktyvinimas buvo patvirtintas kaip esminis žingsnis atsirandant ir vystantis žmogaus navikams. AKT yra serino-treonino kinazė, aktyvuojama augimo faktorių arba išgyvenimo faktorių per PI3K, kad būtų skatinamas ląstelių augimas ir išlikimas. Įprasta kelio aktyvacija atsiranda dėl skirtingų ir (arba) vienas kitą papildančių biologinių įvykių, įskaitant (a) konstitutyviai aktyvinančias mutacijas arba receptorių tirozino kinazių (RTK) amplifikaciją; (b) PI3K amplifikaciją; (c) PIK3CA geno, koduojančio p110α katalizinį subvienetą, aktyvinančias mutacijas; (d) kinazės AKT padidintą raišką; (e) p53 geno fosfatazės ir tenzino homologo (PTEN), endogeninio neigiamo PI3K kelio regulatoriaus, praradimą arba išaktyvinančias mutacijas; arba f) nuolatinių mutavusių RAS onkogeno formų pritraukimą ir aktyvinimą. Viena svarbi PI3K funkcija ląstelėse yra apoptozės slopinimas, o AKT tarpininkauja šiems nuo PI3K priklausomiems ląstelių išgyvenimo signalams. AKT yra antiapopozinis daugelio skirtingų ląstelių mirties dirgiklių veiksnys, įskaitant oksidacinį ir osmosinį stresą, švitinimą ir gydymą chemoterapiniais vaistais, bei išeminį šoką; jos aktyvacija ir per didelė raiška dažnai siejama su atsparumu chemoterapijai ar radioterapijai. Tokias funkcijas patvirtino tyrimai, kuriuose PI3K slopikliai pajautrino ląsteles vaistams, taip pat ir PTEN padidinta raiška bei dominuojantys neigiami AKT geno mutantai (Hirai et al. 2010). Žinomos mutacijos (dažnis apie 1%) ir pačiuose AKT koduojančiuose genuose (Hua et al. 2021).

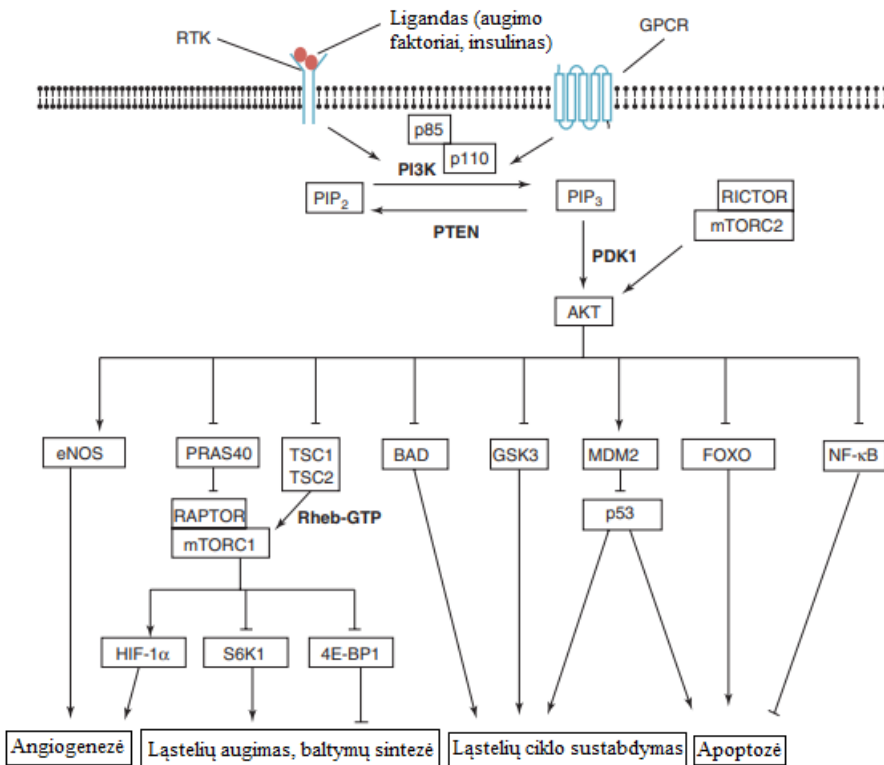
AKT kartu su PI3K yra pagrindiniai AKT signalinės kaskados elementai, geriau žinomi kaip PI3K/AKT signalo perdavimo kelias, kuris skatina ląstelių išgyvenamumą ir augimą, reaguojant į užląstelinius signalus (Arcaro and Guerreiro 2007). AKT signalinė kaskada gali būti aktyvinama receptorinėmis tirozino kinazėmis, integriniais, B ir T ląstelių receptoriais, citokinų receptoriais, su G baltymu susijusiais receptoriais ir kitais aktyvatoriais, kurie skatina PIP₃ gamybą (Sasaki, Yamashita, and Kuniyasu 2015; Davis, Lehmann, and Li 2015).

Aktyvus AKT sukelia specifinį citozolio ir branduolio substratų, tarp jų PRAS40, glikogeno sintazės kinazės 3β (GSK 3β), su apoptoze susijusius BCL-2 šeimos baltymų ir FOXO baltymų fosforilinimą. Be to, AKT

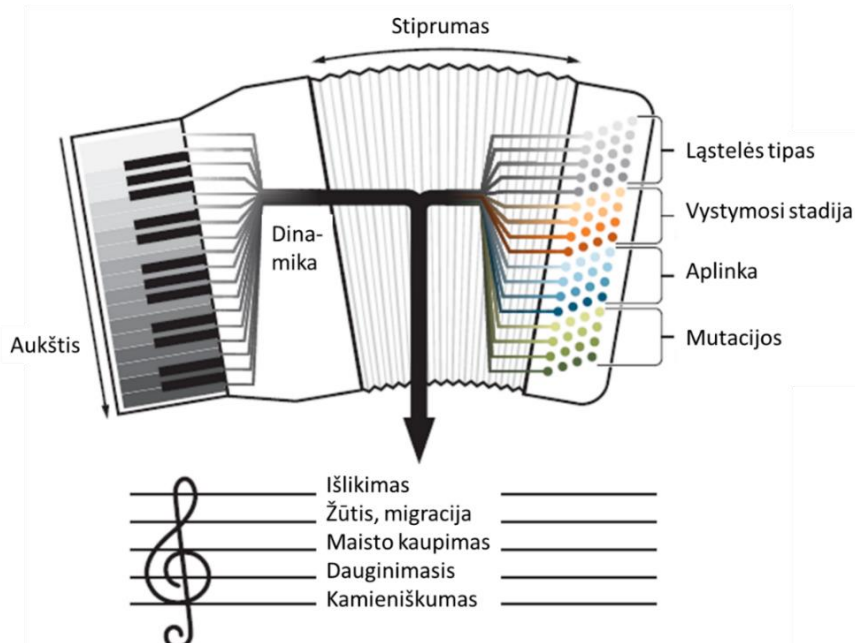
fosforilina ir slopina baltymą TSC2, sukeliant žinduolių rapamicino taikinio (mTOR) aktyvaciją (A4 pav).

Pagrindinis neigiamas šio signalinio kelio reguliatorius yra PTEN (fosfatazės ir tenzino homologo) lipidinė fosfatazė, kuri paverčia PIP₃ į PIP₂, pašalindama 3' fosfatą iš PIP₃. PI3K/AKT kelias neigiamai kontroliuoja PTEN transkripcijos lygyje, reguliuodamas transkripcijos faktorių NF-κB ir naviko nekrozės faktorių α (TNFα), kuris savo ruožtu slopina PTEN raišką (M Shariati 2019).

PI3K/AKT/mTOR signalinis kelias atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant įvairias ląstelių funkcijas, įskaitant ląstelių augimą, dydį, proliferaciją, išgyvenimą, gliukozės metabolizmą, genomo stabilumą, transkripciją ir baltymų sintezę (A5 pav.). Viena iš pagrindinių funkcijų yra skatinti augimo faktoriaus sukeliama ląstelių proliferacija, išgyvenimą ir slopinti apoptozę (Bellacosa et al. 2005; NITULESCU et al. 2016).



A4 pav. Pagrindinės molekulės, dalyvaujančios PI3K/AKT signaliniame kelyje (M Shariati 2019).



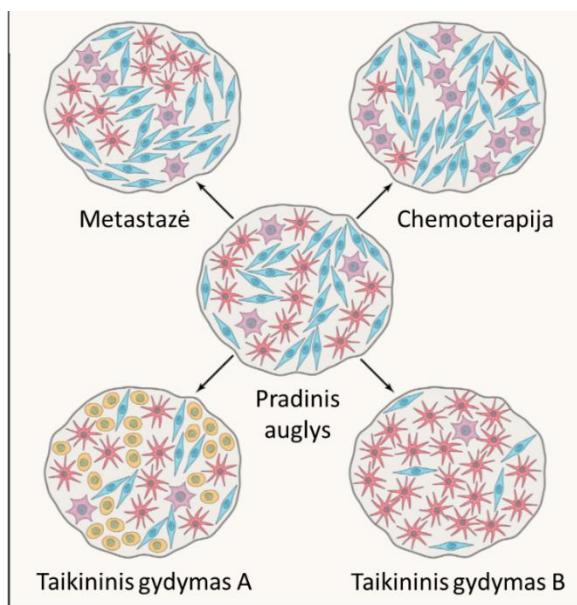
A5 pav. Melodija, išgaunama akordeonu, yra kompleksinis signalo dažninės moduliacijos, dinamikos, stiprumo ir bosų derinys. Panašiai, PI3K/AKT signalinis kelias, reaguodamas į aplinkos parametrus bei į momentinę vidinę situaciją (ląstelės tipas, vystymosi stadija, mutacijų pobūdis), gali nukreipti ląstelės funkcionavimą įvairiomis kryptimis. (Madsen and Vanhaesebroeck 2020)

AKT signalinio kelio tyrimai biomedicininėje literatūroje cituojami daugiau negu 80.000 kartų.

1.6. Atsparumas vaistams ir to priežastys

Vis labiau suprantama, kad atsparumas vėžiui atsiranda beveik visiems pacientams, neatsižvelgiant į naudojamą terapiją (tikslinius/taikinius vaistus, chemoterapiją, spindulinį gydymą ar imunoterapiją) (A6 ir A7 pav.). Tas pat galioja ir plaučių vėžiui (Neel and Bivona 2017)(Majeed et al. 2021). Tiriant plaučių vėžio ląstelių liniją PC9 pastebėta, kad nedidelė dalis, apie ~0,3 % pradinės populiacijos, ląstelių išgyveno paveikus mirtina EGFR inhibitoriaus erlotinibo doze. Ši lėtai besidalinanti, ramybės būsenoje esanti ląstelių subpopuliacija laikui bėgant vėl pradėjo proliferaciją esant erlotinibui. Manoma, kad „ramybės būseną“ reguliuoja histonų demetilazės. Tas pat stebėta ir kitų plaučių vėžio, melanomos, storosios žarnos vėžio ir krūties vėžio ląstelių linijose, veikiant įvairiais vaistais (cisplatina, EGFR

inhibitoriais, RAF inhibitoriumi ir MET inhibitoriumi) (Cabanos and Hata 2021). Atsparios ląstelės gali egzistuoti prieš gydymą vaistais; tačiau epigenetinis perprogramavimas gali būti labai svarbus, kai vaistams atsparios būsenos yra funkciškai heterogeniškos, kintančios ir laikinos, priešingai nei stabilesnis atsparumas vaistams, atsirandantis dėl genetinių pakitimų. Atsparumas vaistams – sudėtingas procesas. Naviko atsparumo priežastys gali būti tiek vidinės, tiek išorinės, ir jis vystosi naudojant daugybę skirtingų mechanizmų. Mūsų publikacijoje (Stulpinas et al. 2020) apžvelgti ir aptarti atsparumo atsiradimo galimi mechanizmai (genetiniai ir neigenetiniai, veikiantys kartu ar atskirai), taip pat priežastiniai veiksniai, įtakojantys šį procesą bei būdai, suteikiantys šį atsparumą ląstelėms.



A6 pav. Kad ir kaip begdytum vėžį, nesėkmė garantuota? (Hahn, Bader, Braun, Califano, Clemons, Yoda, et al. 2021)

Navikai sudaryti iš nevienalytės vėžio ląstelių populiacijos, nesvarbu, fenotipiškai ar genetiškai, vėžys pasižymi ląstelių heterogenišku tiek erdveje, tiek laike. Net po piktybinės transformacijos vėžio ląstelių klonai išlieka dinamiškai ir toliau kaupia mutacijas, keičiasi jų fenotipinės savybės. Vienas iš fenotipo pokyčių mechanizmų yra EMT (epitelinis mezenchiminis virsmas). Kartu atsiranda ir nevienodas jautrumas gydymui, virstantis atsparumu vaistams.

Heterogeniškumui paaiškinti buvo pasiūlyti įvairūs modeliai. Klonų evoliucijos, arba mutacijų, modelis teigia, kad somatinės mutacijos stochastiniu būdu atsiranda įvairiuose naviko klonuose skirtingose vietose ir

skirtingose ligos stadijose. Dėl šių mutacijų atsiranda skirtingi augimo modeliai ir susidaro erdvinis-laikinis naviko heterogeniškumas. **Kloninės evoliucijos modelyje** (kuris yra tiesinis arba šakotas) naviko ląstelių įgytos genetinės mutacijos lemia jų pakitusį fenotipą ir atsparumo gydymui skirtumus. Šiuos biologinių savybių skirtumus paveldi atskiri vėžio ląstelių klonai. Tokiu būdu genomo nestabilumas lemia ląstelių kitimą, taip pat įgytą atsparumą. Šia teorija šiuo metu daugiau remiamasi, kuriant vaistus konkrečiam baltymui, turinčiam konkrečią mutaciją.

Tyrimų išvados rodo, kad genetinių, epigenetinių ir funkcinių mechanizmų derinys prisideda prie vėžio heterogeniškumo ir skirtingo jautrumo priešvėžiniam gydymui. Vėžinių ląstelių būsenų heterogeniškumas yra susijęs su skirtingu atsparumu vaistams, vėžio progresavimu ir vėžio kamieninėmis ląstelėmis. Be to, jis dinamiškai keičiasi laikui bėgant ir kartu su terapijos keitimu.

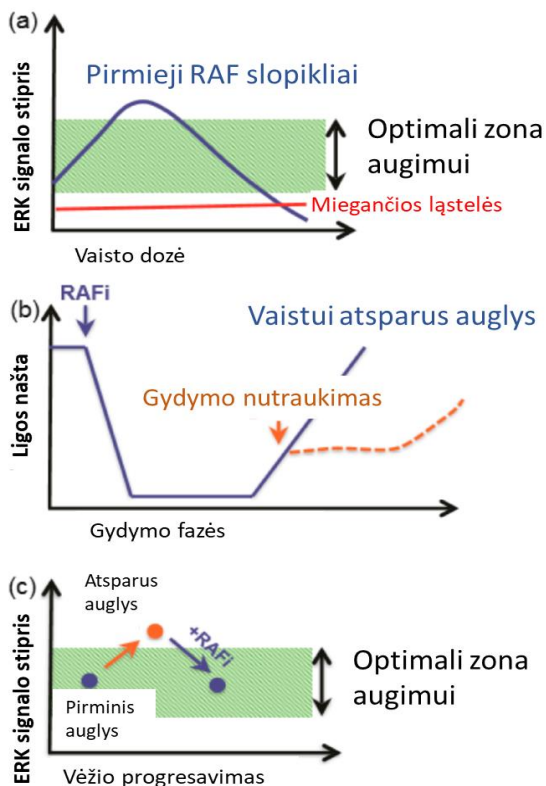
Vėžio kamieninių ląstelių (CSC) modelyje teigiama, kad CSC egzistuoja skirtinguose išsivystymo lygiuose ir turi skirtingus fenotipus, todėl nėra universalių CSC žymenų navike (Nimmakayala, Batra, and Ponnusamy 2019). Jos tiek genetiškai, tiek fenotipiškai, yra nevienalytės ir identifikuojamos kaip maža vaistams atsparių, galimai naviką inicijuojančių ląstelių populiacija, sudaranti mažiau kaip 1% naviko ląstelių. Nepaisant to, CD44, CD90, CD133 yra laikomi susijusiais žymenimis, kurie galimai nurodo kamienines vėžines ląsteles (Dzobo et al. 2021). Naujausi duomenys rodo, kad vėžio progresavimo metu pastebimas laipsniškas diferencijuoto fenotipo ląstelių praradimas ir tuo pat metu ląstelių su kamieninių ląstelių savybėmis skaičiaus padidėjimas. Ląstelės su dediferencijuotu fenotipu labiausiai išryškėja metastazių metu. Reaguodamos į įvairius veiksnius, tokius kaip žaizdos, stresas ar hipoksija, diferencijuotos vėžio ląstelės gali dediferencijuotis į kamienines. Grįžtamieji perėjimai tarp CSC ir ne-CSC navike lemia jo heterogeniškumą.

Kita teorija, vadinamasis **fenotipinis plastiškumo modelis**, leidžia manyti, kad vėžio ląstelės geba perjungti įvairias transkripcijos programas, todėl įvyksta fenotipinis ir histologinis virsmas. Šiame modelyje, skirtingai nuo klonų evoliucijos ir kamieninių ląstelių teorijų, molekuliniai pokyčiai yra grįžtami. Todėl kartais yra svarbu nustatyti įvairių genų, atsakingų už EMT virsmus, mRNR raišką konkrečiais laiko momentais. EMT stebimas ir klinikoje pacientams, įgyjantiems atsparumą vaistams.

EMT procesai yra reguliuojami atsakant į aplinkos pokyčius, kurie aktyvina tiek kanoninius, tiek vystymosi signalinius kelius, o šie skatina transkripcijos veiksnių, vadinamų EMT „pagrindiniais reguliatoriais“ raišką, taip pat epigenetinius ir potransliacinius reguliatorius. Tai apima SNAIL ir

ZEB transkripcijos faktorių šeimų narius. Įvairūs signaliniai keliai, pvz., Wnt/ β -katenino kelias arba AKT/STAT3, prisideda prie EMT. Epitelinio-mezenchiminio perėjimo metu susidaro platus hibridinių epitelio/mezenchiminių ląstelių būsenų spektras, jungiantis epitelio ir mezenchiminius požymius.

Vis labiau suprantama, kad naviko ląstelių plastiškumas gali paveikti gydymo rezultatus. EMT suteikia vėžio ląstelėse atsparumą ląstelių mirčiai, kurią sukelia įvairūs veiksniai, įskaitant įprastus, taikininis ir imunologinius vaistus (A7 pav.).



A7 pav. Optimalus ERK signalas yra būtinas naviko augimui. (a) Pirmosios kartos RAF slopikliai paradoksaliai aktyvino ERK signalą vėžio ląstelėse, kuriose nustatytas aktyvus/mutuotas RAS, ir tik labai didelės vaisto dozės veikė. (b) Vaistams atsparūs navikai priklauso nuo vaisto, kad augimas būtų optimalus, todėl vaisto pašalinimas sulėtina naviko progresavimą. (c) ERK signalo stipris yra esminis raktas į (b) paveiksle parodytą fenomeną gydant RAF slopikliais ir gydymą nutraukus. RAF inhibitorius grąžina ERK signalizavimą į optimalią zoną, todėl gydymas vėl gi neefektyvus. (Degirmenci, Wang, and Hu 2020)

Vėžio ląstelių sąveika su stromos ir kitomis aplinkos ląstelėmis žinoma kaip tiesioginės ląstelių sąveikos lemiamas atsparumas vaistams. Vienos iš labiausiai tiriamų tos aplinkos ląstelių, suteikiančių atsparumą, yra su vėžiu asocijuoti fibroblastai (CAF, cancer associated fibroblasts). Įvairūs tirpūs mediatoriai tokie kaip citokinai, augimo veiksniai, sekretuojami vėžio aplinkos ląstelių, taip pat dalyvauja vėžio ląstelių reguliacijoje, vėžio progresijoje ir svarbiausia dalyvauja suteikiant vėžio ląstelėms atsparumą terapijai. Čia taip pat svarbų vaidmenį vaidina su vėžiu asocijuoti fibroblastai. Yra manoma, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės nepakankamai įvertintos jų vaidmens vėžio vystymesi požiūriu (Lazennec and Lam 2016). Kita vertus, priešvėžiniai vaistai kartais veikia netiksliai ir žūna sveikos, suaugusio organizmo kamieninės ląstelės, nes kamieninės ir vėžinės ląstelės turi daug panašių bruožų (Hook 2012)(Kalvelyte et al. 2013). Teigiama, kad didžioji dalis naujų priešvėžinių vaistų kandidatų nepasiekia II ir III klinikinių tyrimų stadijos dėl toksiškumo širdžiai, kepenims, kraujodarai, odai ir kt. (Basak et al. 2021)(D. Sun et al. 2022).

Užląstelinis matiksas taip pat yra didele dalimi atsakingas už heterogeninių ląstelių, kurios pasižymi ir skirtingu atsaku/jautrumu priešvėžiniams poveikiams, populiacijos atsiradimą. Dėl jo dinamiškumo vėžinėse ląstelėse per adhezijos baltymus aktyvuojami skirtingi signaliniai keliai. Atskira vėžio tyrimų kryptis – cirkuliuojančios vėžio ląstelės, praradusios užląstelinius kontaktus su substratu, ir pavieniui ar sancaupose (klasteriuose) keliaujančios po visą organizmą. Jose signaliniai keliai ir metabolizmas yra skirtingi nuo pirminio naviko (Jong, Chan, and Nedelcu 2019a). Manipuliavimas chemoterapinių vaistų sukeltu signalizavimu, išsaugant navikinio audinio heterogeniškumą, yra perspektyvi taikininio vėžio gydymo strategija.

Vėžinėms ląstelėms yra būdingi kartu suaktyvinti MAPK/ERK ir PI3K/AKT keliai. PI3K suaktyvavimas yra įprastas atsiradusių vėžinių ląstelių atsparumo mechanizmas, o PI3K slopikliai gali būti naudojami vėžinių ląstelių jautrumui padidinti. Nepaisant to, aktyvinimas kompensacinio signalinio kelio, kaip atsakas į slopinimą pagrindinio taikinio, yra vienas iš mechanizmų, dėl ko vėžinės ląstelės nejautrios gydymui, kai taikininiais vaistais slopinamas tik vienas, o ne abu signaliniai keliai (Manstein et al. 2014)(J.-Y. Kim et al. 2016).

1.7. Taikinių terapija

Taikininė terapija vienas naujausių gydymo metodų. Ji naudojama ne tik vėžio, bet ir kitų sutrikimų gydymui ir profilaktikai. Dabartinė vėžio terapijos

kryptis – perėjimas nuo nespecifinių citotoksinių vaistų prie racionaliai kuriamų ir į konkrečią molekulę nukreiptų, sąlygojančių didesnę efektyvumą ir mažesnius pašalinius efektus, junginių. Tam būtina suprasti vėžio biologiją bei nustatyti ligos „aktyviusius“ molekulinis taikinius. Tačiau naudojant šią terapiją yra reikalinga išsami taikinių bei taikinių vaistų analizė konkrečiose lėtinių ligų sistemose bei individualiais atvejais. Pvz., streso kinazės JNK dalyvauja tokių lėtinių neinfekcinių susirgimų kaip širdies ir kraujagyslių ligos, cukrinis diabetas, neurodegeneracinės ligos, piktybinių navikų atsiradime.

Viena iš esminių vėžinės ląstelės savybių yra apoptozės sutrikimas, todėl ląstelės žūtį reguliuojančios signalinės molekulės yra vienas iš pagrindinių taikinių šiuolaikinėje vėžio terapijoje (Agostini, Tucci, and Melino 2011) (Petak, Houghton, and Kopper 2008). 2020 metais net aštuoni baltymų kinazių slopikliai buvo patvirtinti FDA vėžio gydymui (Cicenas and Račienė 2021).

Plačiai žinomas mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių (ERK, JNK ir p38) kaskadų, dalyvavimas perduodant ląstelių žuvimo/išgyvenimo signalus leidžia atskiras kinazes naudoti kaip taikinius terapijoje (Dhillon et al. 2007). Randasi vis daugiau duomenų apie JNK vaidmenį neurodegeneratyvinių susirgimų vystymesi. Tyrimai rodo, kad pakitimai JNK kelyje yra susiję su neuronų žūtimi Parkinsono ir Alzheimerio susirgimų atveju, todėl JNK galėtų būti taikiniu siekiant sustabdyti neurodegeneracinius procesus (Waldmeier 2007).

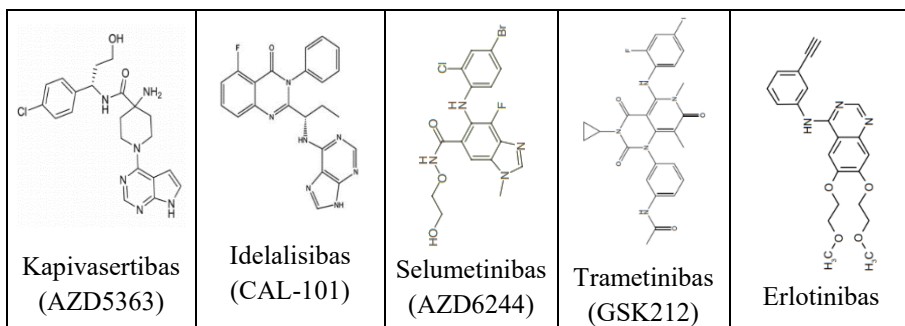
Baltymų kinazės JNK kelias yra žinomas kaip atsako į stresą signalinis kelias. Jis taip pat dalyvauja ir reguliuojant fiziologines ląstelės funkcijas, o jo reguliacijos sutrikimai apsprendžia daugelį lėtinių susirgimų. Baltymų kinazių tyrimai žmogaus vėžio atveju parodė galimas mutacijas JNK signaliniame kelyje, o genų raiškos tyrimai klinikiniuose prostatos vėžio pavyzdžiuose parodė JNK kelio komponentų raiškos padidėjimą (Wagner and Nebreda 2009). Literatūroje yra žinomas JNK slopiklių terapinis potencialas: JNK slopinimas pasižymi priešvėžiniu veikimu kiaušidžių vėžio, galvos ir kaklo plokščialąstelinės karcinomos atvejais. JNK kinazių modulatoriai yra laikomi ateities vaistais gydant vėžį, diabetą, širdies ir kraujagyslių sistemos ligas (Cicenas et al. 2017)(Weston and Davis 2007) (Harper ir Grass, 2001; Yao ir kt, 2009; Milano, 2007). Tiek *in vitro*, tiek *in vivo* sistemose parodytas JNK dalyvavimas skatinant nes mukialąstelinio plaučių vėžio ląstelių proliferaciją bei stabdant jų žūtį, o taip pat ir sinerginis JNK bei PI3K/Akt veikimas, apsaugantis vėžines ląsteles nuo terapinių poveikių (H. Y. Lee et al. 2005).

Informacinės technologijos daro pažangą, ir reikia pasidžiaugti, kad randami vis nauji junginiai, efektyviai slopinantys įvairius svarbius

molekulinius taikinius. Pvz. onkogenas RAS tris dešimtmečius buvo laikomas „beviltišku“ („undruggable“), kai 2019 metais buvo pradėti klinikiniai tyrimai su sotorasibu, G12C KRAS mutaciją neutralizuojančiu junginiu. Deja, kaip monoterapija ar deriniuose šis ir panašūs slopikliai tik trumpam prislopina vėžio progresavimą, ir nors gali būti vadinami „vaistais“, bet nuo ligos neišgydo (Punekar et al. 2022).

Pastaraisiais metais vaistai, skirti PI3K ar AKT slopinimui, buvo plačiai kuriami ir yra išbandomi klinikinių tyrimų metu. Šiuo metu, FDA yra patvirtinusi tris šio signalinio kelio slopiklius folikulinės limfomos gydymui: idelalisibą, copanlisibą, ir duvelisibą (Coleman et al. 2021), nesmulkialąsteliniam plaučių vėžiui gydyti klinikiniuose tyrimuose buvo ipatasertibas ir perifosinas, tačiau tyrimai buvo nutraukti. Ne tik šio signalinio kelio, bet ir taikininės terapijos apskritai trūkumas yra susijęs su saugumo problemomis. Nors tikėtasi, kad toks gydymas turėtų būti netoksiškas normalioms ląstelėms, kurios neturi priklausomybės nuo onkogeno, visgi dažnai matomas didelis šalutinis poveikis. Selektivumas buvo laikomas taikininės terapijos pranašumu, lyginant su įprastine chemoterapija; nepaisant to, viduriavimas, kepenų, inkstų ir odos problemos, aukštas kraujo spaudimas, autoimuninės reakcijos, taip pat antriniai auglių atsiradimai gali būti taikininio vėžio gydymo pasekmės (Kalvelytė et al. 2017b). Papildomai, didelis ir gan greitai atsirandantis atsparumas šiems vaistams riboja taikinių vaistų priešnavikinį veiksmingumą (Faes and Dormond 2015).

Kapivasertibas (AZD5363) (A8 pav.) yra ATP konkurencinis slopiklis, slopinantis visas tris AKT izoformas (AKT1, AKT2, AKT3). Iiklinikinių tyrimų metu, buvo parodyta jog, kapivasertibas slopina PRAS40 ir GSK3β (AKT substratų), taip pat S6 ir 4EBP1 fosforilinimą, tačiau tai padidina AKT fosforilinimą į Ser473 ir Thr308 (Maryam Shariati and Meric-Bernstam 2019). Naujaisiais duomenimis, kapivasertibas gali būti laikomas nevisiškai savitu slopikliu dėl štai tokių IC50: 3 nM (Akt1), 7 nM (Akt2), 7 nM (Akt3), 6 nM (p70S6K), 7 nM (PKA), 60 nM (ROCK2) (Tsai et al. 2022).



A8 pav. Slopiklių-vaistų cheminės struktūros.

Klinikinio tyrimo metu, kapivasertibas buvo skiriamas pacientams, turintiems naviką su AKT mutacija (AKT1 E17K), įskaitant ER teigiamą/trigubai neigiamą krūties, kiaušidžių, plaučių, prostatos ir storosios žarnos vėžį. Buvo pastebėta, jog kapivasertibas, kaip atskiras vaistas, davė dalinį atsaką dviem atvejais – krūties ir kiaušidžių vėžiu, abu su AKT1 E17K mutacija (M. Song et al. 2019a). Be to, metastazavusio trečios stadijos krūties vėžio kombinuotas gydymas kapivasertibu su paklitakseliu parodė ilgesnį išgyvenamumą, be tolimesnio ligos progresavimo ir reikšmingą bendro išgyvenamumo padidėjimą (Maryam Shariati and Meric-Bernstam 2019b). Naujausiais duomenimis (2022 spalio 26 d.), kapivasertibas derinyje su fulvestrantu/Faslodex CAPItello-291 Phase III klinikiniame tyrime pasirodė patikimai pailginantis pacientų išgyvenamumą tam tikrais krūties vėžio atvejais <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2022/capivasertib-phase-iii-trial-met-primary-endpoints.html>.

Idelalisibas (GS-1101, CAL-101, Zydelig®) yra lengvai į ląsteles patenkantis, mažos molekulinės masės baltymo PI3K delta izoformos (p110δ) slopiklis. Slovindamas PI3Kδ baltymą, idelalisibas blokuoja kelis ląstelių signalinius kelius, palaikančius B ląstelių gyvybingumą. Idelalisibas yra pirmasis PI3K slopiklis, kurį patvirtino JAV maisto ir vaistų administracija. Gydymas idelalisibu skiriamas esant recidyvuojančios/refrakterinės lėtinės limfocitinės leukemijos, folikulinės limfomos ir mažos limfocitinės limfomos atvejais (Schlenk and Kayser 2018).

Šiuo metu yra keturi MEK1/2 slopikliai, patvirtinti kaip priešvėžiniai vaistai: trametinibas (2013 m.), kobimetinibas (2015 m. melanomai), binimetinibas (2018 m. melanomai), selumetinibas (2020 m. neurofibromai), kurie buvo išbandyti su daugeliu skirtingų vėžio rūšių, įskaitant plaučių NSCLC. ERK1/2 slopiklis SCH772984 yra naujas, daug žadantis junginys ikiklinikiniuose tyrimuose. Taip pat šiam keliui blokuoti naudojamas EGFR

slopiklis erlotinibas, kuris dažniausiai yra kombinuojamas kartu su selumetinibu arba trametinibu (Stinchcombe and Johnson 2014).

Iki 2020 m. spalio mėn buvo registruoti 22 klinikiniai tyrimai su MEK taikininiais vaistais NSCLC pacientams (Han et al. 2021).

Selumetinibas (AZD6244; ARRY-142866) yra lengvai į ląsteles patenkanti, maža molekulė, veikianti kaip stiprus, selektyvusis ir ATP nekonkurentinis (jungiantis MEK greta ATP surišimo vietas) MEK1/2 slopiklis.

Ikiklinikinis NSCLC pelės modelis su KRAS mutacija parodė stiprų naviko augimo slopinimą. Šis poveikis susijęs su reikšmingu fosforilinto ERK viduląstelinio lygio sumažėjimu (Metro et al. 2013). Yra keletas labai sėkmingų ne NSCLC selumetinibo tyrimų, kuriuose dalyvavo, pvz., pacientai, sergantys su 1 tipo neurofibromatoze susijusiais navikais, ir vaikai, sergantys žemo laipsnio BRAF sukeltomis gliomomis (Imyanitov et al. 2020).

Svarbu tai, kad keli ikiklinikiniai tyrimai, atlikti tiek *in vitro*, tiek *in vivo*, naudojant žmogaus ksenograftinių navikų modelius, parodė, kad selumetinibas gali būti veiksmingesnis, kai jis derinamas su kitais priešvėžiniais preparatais, įskaitant standartinius citotoksinius vaistus ir naują taikinių terapiją. Selumetinibo ir docetakselio poveikis yra sinerginis žmogaus ksenograftinių navikų modelyje (Casaluce et al. 2017; Metro et al. 2013). Tačiau selumetinibo naudojimas kartu su tirozino kinazių slopikliais (erlotinibu, osimertinibu, afatinibu) pasižymėjo daugiau sunkiais šalutiniais poveikiais, nei pailgino pacientų gyvenimo trukmę (Han et al. 2021).

Trametinibas (GSK212) yra stiprus ir selektyvus, lengvai į ląsteles patenkantis, alosterinis MEK1 ir MEK2 slopiklis, kuris stipriai slopina ERK1/2 aktyvaciją įvairiose vėžinių ląstelių linijose ir ksenograftinių navikų modeliuose. Trametinibas specifiskai jungiasi su MEK1 ir MEK2, todėl slopinamas augimo faktoriaus sąlygotas ląstelių signalinis kelias ir ląstelių proliferacija įvairiuose vėžio rūšyse. 2013 metais trametinibas buvo patvirtintas JAV maisto ir vaistų administracijos, kaip MEK slopiklis BRAF V600E mutacijoms (Wright and McCormack 2013; Heigener, Gandara, and Reck 2015; Banks et al. 2017).

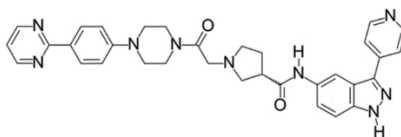
Ikiklinikiniai nesmulkiają ląstelinio plaučių vėžio ląstelių linijos tyrimai parodė, kad naviko ląstelėse, turinčiose BRAF V600E mutaciją, BRAF ir MEK slopinantys vaistai (vienas iš jų yra trametinibas) monoterapijos būdu jas veikia proapoptoziskai (Weart, Miller, and Simone II 2018).

Trametinibas buvo naudojamas kartu su chemoterapiniais vaistais docetakseliu arba pemetreksedu, pacientams, kuriems anksčiau jau buvo

taikytas gydymas prieš pažengusią NSCLC su KRAS mutacija. (Jeanson et al. 2019).

Erlotinibas yra chinazolino darinys, kuris yra labai selektyvus ir ATP konkurentinis (blokuoja ATP jungimosi vietą) EGFR tirozino kinazės slopiklis. Jis grįžtamai prisijungia prie EGFR tirozino kinazės viduląstelinio katalizinio domeno, taip slopindamas EGFR fosforilinimą ir blokuodamas signalo perdavimą ir naviko augimą susijusį su EGFR aktyvacija (Shriman and Jain 2019; T. C. Liu et al. 2017). 2004 metų lapkričio 18 dieną erlotinibas buvo JAV maisto ir vaistų administracijos patvirtintas nesmulkiają plaučių vėžiui gydyti (Cohen MH, Johnson JR, Chen YF, Sridhara R 2005).

SCH772984 yra indazol-pirolidino darinys (A9 pav.) SCH772984 yra unikalus ERK1/2 slopiklis, nes jis ne tik jungiasi ir slopina ERK1/2 kinazę, bet ir prisijungęs prie ERK1/2 sukelia konformacinius pokyčius, užkirsdamas kelią ERK1/2 fosforilinimui. SCH772984 taip pat sukelia ilgalaikį ERK1/2 signalo perdavimo efektorių slopinimą, laikiną MEK sukeltą ERK fosforilinimo slopinimą, sumažina ląstelių proliferaciją ir padidina jų apoptozę (Moschos et al. 2018).



A9 pav. SCH772984 cheminė struktūra

1.8. Kombinuotas AKT/ERK slopinimas

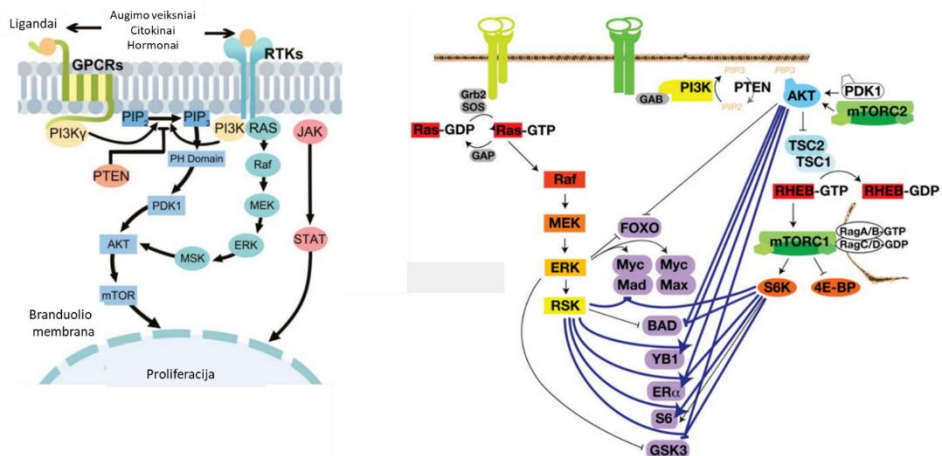
MAP kinazė ERK ir baltymų kinazė AKT yra žinomos kaip ląstelių išgyvenimo kinazės, vėžio atveju jos perduoda ląstelių proliferacijos ir išgyvenimo signalus. ERK svarbus ląstelių migracijoje, išgyvenamume, diferenciacijoje, metabolizme, proliferacijoje ir genų transkripcijoje. PI3K/AKT kelias taip pat dalyvauja svarbiose fiziologinėse funkcijose, tokiose kaip ląstelių išgyvenamumas ir augimas, reaguojant į užląstelinius signalus. Daugeliu vėžio, tarp jų ir plaučių, atvejų yra žinomi šių signalinių kelių komponentų onkogeniniai persitvarkymai, dėl ko ląstelių dalinimasis tampa nereguliuojamas (Hedayat, Jafari, and Majidi Zolbanin 2022)(Smorodinsky-Atias, Soudah, and Engelberg 2020)(Zhang et al. 2017)(Mundi et al. 2016)(Lee, Jr. et al. 2008)(McCubrey et al. 2012). Todėl jų kaip taikinių naudojimas plaučių vėžio atveju abejonių nekelia (M. W. Lee et al. 2011) (Akca et al. 2011)(M. Song et al. 2019b).

Kadangi vėžį sukelia genetinės mutacijos, genetinių naviko požymių nustatymas yra labai svarbus vėžio gydymui. Tačiau daugėja įrodymų, kad net taikininė terapija, kai vaistas neutralizuoja konkrečios onkogeninės mutacijos pasekmes, yra veiksminga tik trumpą laiką, ir pacientas iki galo nepasveiksta. Nors dažnu atveju taip atsitinka dėl naujų, papildomų mutacijų, atsparumą vaistams visgi lemia ne vien tik genetiniai mechanizmai: negenetinė ląstelės būklės moduliacija taip pat gali padaryti didelę įtaką ir lemti atsparumą tiek įprastiniams citotoksiniams, tiek taikininiais vaistams.

Atrodytų, į konkrečius signalinius kelius nukreipti vaistai suteikia naujų gydymo strategijų (Grandori and Kemp 2018)(Fennell et al. 2022)(Panda and Biswal 2019), deja, jų ribotas priešvėžinis aktyvumas, galimai dėl kompensacinio AKT-ERK signalų kelių aktyvinimo, yra viena iš pagrindinių kliūčių juos naudoti gydymui.

Šių dviejų signalinių kelių sąveika įrodyta įvairiuose ir skirtingų vėžio ląstelių modeliuose (ZHANG et al. 2016)(K. S. Saini et al. 2013)(Fritsche-Guenther et al. 2016)(Britten 2013)(Yuen et al. 2012). Tačiau vyrauja nuomonė, kad grįžtamasis ryšys tarp AKT ir ERK kelių priklauso nuo ląstelių linijos ir nuo konkrečių onkogeninių mutacijų vėžinėse ląstelėse. Manoma, kad ERK ir AKT kelio taikininis vaistų panaudojimas kartu su įprastine priešvėžine terapija (pvz.: chemoterapija) yra daug žadanti vėžio gydymo strategija. Pvz., chemoterapinio vaisto cisplatinos priešnavikinį poveikį galima būtų sustiprinti, panaudojus taikininis terapinius agentus kartu su cisplatina. Tam, kad toks poveikis būtų pasiektas, reikėtų moduluoti pagrindinius ląstelių išgyvenamumą reguliuojančius signalinius kelius, t.y. ERK ir AKT. Įdomu, kad leukemijos atveju pastebėta, jog SHP2 koduojančio *PTPN11* mutacija sukelia PI3K/mTOR ir RAS/MAPK kelių aktyvaciją vienu metu (Najafi, Ahmadi, and Mortezaee 2019) (Jain et al. 2021)

RAS/MAPK ir PI3K/mTORC1 kelių abipusį kryžminį slopinimą (kai vieno kelio slopinimas išlaisvina signalus per kitą kelią) tyrinėjo ir apžvelgė įvairūs autoriai, aiškindami specifinius signalizuojančių molekulių sąveikos mechanizmus skirtingose vėžio modelinėse sistemose. Tokio grįžtamojo ryšio mechanizmo aktyvinimas pripažįstamas kaip būdas apsaugoti ląsteles nuo vaistų sukeltos mirties (Mendoza, Er, and Blenis 2011)(Aksamitiene, Kiyatkin, and Kholodenko 2012)(Britten 2013). Matyti, kad teigiamo ir neigiamo grįžtamojo ryšio kilpos ir tarpusavio sąveika yra dinamiškos ir sudėtingos, o santykinė kiekvienos sąveikos svarba skirtinguose audiniuose ar navikų tipuose gali skirtis ir priklausyti nuo santykinio signalų stiprumo.



A10 pav. MAPK-PI3K signalinių kelių sąveika (Mendoza, Er, and Blenis 2011) (Yang et al. 2019)

Tarp PI3K/AKT ir RAS/MAPK egzistuoja kelių lygių tarpusavio sąveika. Šie keliai gali būti tarpusavyje susiję ir turėti daugybę susikirtimo taškų įvairiose signalų perdavimo vietose ir fazėse, kryžminio ryšio ir grįžtamojo ryšio kilpose. Abu keliai gali vienas kitą aktyvinti arba slopinti. Kryžminis slopinimas ir kryžminis aktyvinimas, taip pat kelių konvergencija, kartais fosforilinant tą patį to paties baltymo motyvą, yra žinomi. Be to, sąveikavimas priklauso nuo konteksto, įskaitant augimo veiksnių ar kitų dirgiklių koncentraciją. Šia prasme modeliavimo metodai, išnaudojantys pagrindines grįžtamojo ryšio kilpas, buvo naudojami siekiant sukurti naujus potencialius mechanizmus, kurie galėtų paaiškinti ląstelinį atsaką, pavyzdžiui, dalyvaujantį insulino-AKT ir MEK/ERK signalinių kelių kryžminiame sąveikavime (Mendoza, Er, and Blenis 2011)(Aksamitiene, Kiyatkin, and Kholodenko 2012)(Britten 2013)(Arkun 2016).

Literatūroje aprašyti įvairūs šių dviejų pagrindinių signalinių kelių sąveikos įvairiose ląstelių sistemose mechanizmai ir priežastys (Najafi, Ahmadi, and Mortezaee 2019). Darbuose nurodoma signalinių kelių sąveikos priklausomybė nuo ląstelės mutacinio statuso. Pavyzdžiui, tiriant RAF slopiklių poveikį PI3K/AKT signalams, nustatyta, kad AKT fosforilinimas ląstelėse gali kisti priešingai, priklausomai nuo dviejų svarbių onkogenų – KRAS ir BRAF – mutacijų (Fritsche-Guenther et al. 2016). Kiti autoriai, naudodami reprezentatyvią skirtingos kilmės vėžinių ląstelių grupę su žinomu genetiniu profiliu (krūties, plaučių, prostatos, stemplės ir storosios žarnos ląstelių linijas), pabrėžė, kad kompensaciniai mechanizmai ir grįžtamasis ryšys tarp PI3K/AKT ir RAS/MEK/ERK kelių priklauso nuo ląstelių linijos ir

kad lemiamas vaidmuo tenka onkogeninėms mutacijoms. Parodyta, kad grįžtamasis ryšys tarp šių dviejų kelių vyksta tik ląstelėse su *KRAS* mutacija ir *cMET* amplifikacija, bet ne izogeninėse laukinio tipo ląstelėse dėl mechanizmo, kuris galimai susijęs su specifinių endogeninių fosfatazių aktyvumo slopinimu (Yuen et al. 2012). Gauti duomenys leido daryti išvadą, kad pirminių navikų genetinis potipio nustatymas dėl *KRAS* mutacijos arba *cMET* amplifikacijos būtų vertingas prognozuojant naviko atsaką į tokius slopiklius. Be to, Turke su kolegomis (Turke et al. 2012) aprašė mechanizmą, pagal kurį MEK slopina ERBB receptorių (EGFR ir HER2) fosforilinant tam tikrą aminorūgštį: jos mutacijos neleido ERBB3/PI3K/AKT keliui aktyvuotis po gydymo MEK inhibitoriais.

Kitur aiškinama, kad AKT slopina ERK aktyvumą per tiesioginę sąveiką su RAF, sukeldamas jo inaktyvinimą fosforilinant Ser259 (Zimmermann and Moelling 1999). Kiti galimi mechanizmai, susiję su kompensacine tiriamų kelių sąveika, yra HER2 fosforilinimas pozicijoje Thr701 ir HER2/EGFR sąveika su klatrinu (Chen et al. 2017), taip pat adaptyvūs MAPK pastolinių baltymų (KSR-1, GEF-H1) ir receptorių tirozino kinazių (MET, EGFR) pokyčiai, lemiantys sustiprėjusį PI3K/AKT signalo perdavimą ląstelių linijose su mutavusiu *KRAS* (J.-Y. Kim et al. 2016).

Adaptyvaus atsparumo taikininei terapijai, nukreiptai į RAS/ERK signalinį kelią, tyrimai parodė integrinų, FAK ir nepažeisto aktino citoskeleto vaidmenį metastazavusio trigubai neigiamo krūties vėžio ląstelių pogrupyje. Analizuodami RAS/ERK ir PI3K/AKT signalų tarpusavio sąveikos mechanizmus, autoriai nustatė, kad slopinant RAS/ERK kelią, PI3K/AKT aktyvinimui reikalingas β 1 integrinas, miozino lengvosios grandinės kinazė (MLCK) ir miozinas IIA (Choi et al. 2016). Anksčiau buvo parodyta, kad su integrinu susieta kinazė (ILK) buvo reikalinga tam, kad glioblastomos ląstelėse suaktyvėtų grįžtamasis PI3K/AKT kelio signalo perdavimas po MEK slopinimo (Edwards et al. 2006). Taip pat ir metaboliniai keliai, pavyzdžiui mevalonato kelias, gali būti susiję su AKT aktyvacijos reguliavimu, kurį sukelia gydymas MEK inhibitoriais. Autoriai siūlo, kad kombinuotas gydymas MEK slopikliais ir antilipideminiais vaistais statiniais gali būti perspektyvi terapinė strategija, siekiant pajautrinti vėžines ląsteles apoptozei (Iizuka-Ohashi et al. 2018).

Neigiamo grįžtamojo ryšio kilpos reiškinyje, kai vieno kelio slopinimas gali sukelti kompensacinį kito kelio suaktyvėjimą, pasireiškia įvairiose vėžinėse ląstelėse. Todėl vis dažniau tikrinamas įvairių MEK ir PI3K slopiklių kombinuoto naudojimo veiksmingumas įvairių tipų vėžiui, taikant laboratorinius modelius ir klinikinius tyrimus (Britten 2013)(Cao et al. 2019). Autoriai teigia, kad PI3K/AKT ir RAS/MEK/ERK kelių tarpusavio sąveikos

tinklas gali skirtis skirtinguose audiniuose ar navikų tipuose (H. Zhang et al. 2016)(K. S. Saini et al. 2013)(Fritsche-Guenther et al. 2016)(Britten 2013)(Yuen et al. 2012). Šių signalinių kelių tarpusavio sąveiką gali lemti ligando tipas, ligando koncentracija / signalo intensyvumas ir laiko faktoriai (Moelling et al. 2002). Plaučių vėžio atveju parodyta, kad įgyto atsparumo į receptorių tirozino kinazę orientuotai terapijai (TKI) mechanizmai apima antrinę *EGFR* T790M mutaciją, *MET* amplifikaciją, mezenchiminio-epitelinio perėjimo ir hepatocitų augimo veiksnio aktyvaciją, epitelinio-mezenchiminio virsmo indukciją, kamieninių ląstelių savybių įgijimą, transformaciją iš NSCLC į smulkialąstelinį plaučių vėžį ir kt. Kompensacinis centrinių onkogeninių kelių suaktyvėjimas galėtų būti dar vienas svarbus veiksnys, lemiantis atsparumą vaistams, todėl ir dar vienas taikynys. Autoriai siūlo dvigubą MEK ir PI3K kelių slopinimą pasirinktais inhibitoriais kaip galimą EGFR-TKI atsparaus NSCLC vėžio gydymo strategiją (Sato et al. 2018).

Taigi pacientams, vartojantiems MEK/ERK slopiklius, tinkamiausias derinys galėtų būti PI3K slopiklių taikymas kartu, siekiant blokuoti ERK aktyvavimą ir sureguliuoti vėžinių ląstelių proliferaciją bei jų išgyvenamumą (Misale et al. 2019; Najafi, Ahmadi, and Mortezaee 2019)(Roskoski 2019b).

1.9. Plaučių vėžys ir įprasti vaistai

Plaučių vėžys yra pagrindinė mirčių nuo vėžio priežastis pasaulyje. Nepaisant pasiekimų, tebėra didelis poreikis naujų, inovatyvių gydymo strategijų bei priemonių, padedančių joms atsirasti. Tokios priemonės yra plaučių navikų ląstelių linijos, gautos iš ligonių. Jos yra svarbus įrankis tiriant plaučių navikų bazinius mechanizmus bei naujus terapinius agentus (Gottschling et al. 2012). Plaučių kamieninių bei plaučių vėžio kamieninių ląstelių atradimas pateikia dar vieną reikšmingą priemonę, efektyvinančią taikinių terapijos taikymo tyrimus plaučių vėžiui gydyti (Kajstura et al. 2011b) (Eramo, Haas, and De Maria 2010).

Pasaulyje stebima tendencija vėžio/naviko charakterizavimui nuo histologinės analizės pereiti prie molekulinio/genetinio profiliavimo. Remiantis nustatomais mRNR raiškos pakitimais ar konkrečiomis žinomomis mutacijomis, pacientai skirstomi į grupes, kurioms taikomas skirtingas gydymas. Plaučių vėžyje yra nustatyta keletas tikslingų genetinių pakitimų, iš kurių:

- Daugelio protoonkogenų aktyvinančios mutacijos, įskaitant *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *PI3K*, *MEK* ir *HER2*.

- Protoonkogenų *ALK*, *ROSI*, *NTRK1* ir *RET* struktūriniai pertvarkymai,
- Protoonkogenų amplifikacija, tokių kaip *MET*, *FGFR1* ir *DDR2*,
- Naviką slopinančių genų, įskaitant *TP53*, *RBI*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* ir *PTEN*, išaktyvinimas (Lemjabbar-Alaoui et al. 2015) (Jain et al. 2021).

Plaučių vėžio gydymui gali būti taikoma operacija, chemoterapija, radioterapija, imunoterapija ir taikinių terapija, priklausomai nuo vėžio stadijos. Operacija paprastai laikoma netinkamu gydymo būdu, kai diagnozuojama plaučių vėžio stadija jau yra pažengusi. Chemoterapija tai vienas iš pagrindinių ir efektyviausių būdų kol kas gydyti plaučių vėžį, nepriklausomai ar taikoma tik ji, ar kombinuota su kitu gydymu (Ramesh 2010a).

Nepaisant milžiniškų pastangų, ieškant biocheminių žymenų, kurie palengvintų ankstyvą plaučių vėžio diagnozės nustatymą, šie žymenys yra dar tik tyrimų stadijoje (Ramesh 2010b), tačiau nuo 1980-ųjų, kai taikant geriausią slaugą pacientų išgyvenamumas po NSCLC diagnozės patvirtinimo tebuvo 2-4 mėnesiai, 2015 metais klinikinio tyrimo BEYOND metu įvertinta, kad kombinuota imuninė (bevacizumab) su įprasta (+paklitakselio/karboplatinos) terapija vidutinį išgyvenamumą pailgino iki 24 mėnesių (de Mello et al. 2020).

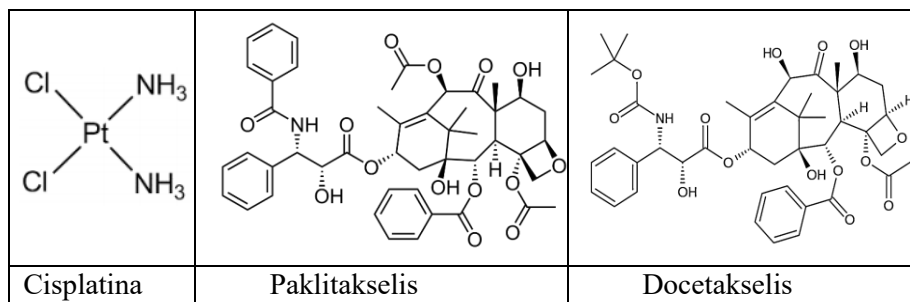
Dabartinis NSCLC gydymas apima nespecifinius, sisteminius chemoterapinius vaistus (cisplatiną, oksaliplatiną, gemcitabiną, paklitakselį, docetakselį, pemetreksedą, vinorelbiną), taip pat taikinius vaistus: mažamolekulinius ląstelių signalo perdavimo taikinių slopiklius (gefītinib, erlotinib, crizotinib, ceritinib, alectinib, osimertinib, afatinib, lorlatinib, selpercatinib); taip pat antikūnus (atezolizumabas, pembrolizumabas, bevacizumabas, necitumumabas, ramucirumabas, nivolumabas) (Ruiz-Ceja and Chirino 2017). Keli nauji taikininiai vaistai (tarp jų entrektinibas, tepotinibas, mobocertinibas ir sotorasibas) yra klinikiniuose tyrimuose, kai kurie iš jų laukia pagreitinto patvirtinimo (Melosky et al. 2021).

Kiek detaliau pristatysime keletą sisteminių vaistų plaučių vėžiui gydyti, kuriuos naudojome savo tyrimams.

1.9.1. Cisplatina

Nuo aštuntojo dešimtmečio pabaigos cisplatina [$\text{cis-Pt}(\text{Cl}_2(\text{NH}_3)_2)$] (A11 pav.) yra gerai žinomas chemoterapinis vaistas. Ji naudota ne vieno vėžio tipo gydymui, įskaitant šlapimo pūslės, galvos ir kaklo, plaučių, kiaušidžių ir sėklidžių vėžį. Cisplatina yra veiksminga poveikiu prieš karcinomas, gemalų

ląstelių navikus, limfomas ir sarkomas (Messori and Merlino 2016a; Dasari and Bernard Tchounwou 2014a).



III pav. Įprastų vaistų, naudojamų plaučių vėžiui gydyti, cheminė struktūra.

Cisplatina aktyvina ne tik vidinius apoptozinius kelius (per endoplazminį tinklą ar mitochondrijų disfunkciją), bet ir išorinį žūties receptorių kelią, kurį sukelia TNF α (Manohar and Leung 2018a).

In vivo molekulinis cisplatinos veikimo mechanizmas sukiant ląstelės žūtį yra susijęs su geru jos pasisavinimu ir prisijungimu prie DNR (Messori and Merlino 2016b), taip pat dėl fakto, kad vėžinės ląstelės dažnai turi defektyvų DNR pažeidimų taisymo mechanizmą. Yra žinoma, kad cisplatina į ląsteles gali patekti varž transportuojančių (Ctr) baltymų pagalba arba per plačiai paplitusius tūrio reguliuojamus anijonų kanalus (VRAC) (Messori and Merlino 2016b)(Rottenberg, Disler, and Perego 2021). Cisplatina aktyvuojama jai patekus į ląstelę, chloro atomus pakeitus vandens molekulėmis. Šis hidrolizuotas produktas yra stiprus elektrofilas, kuris gali reaguoti su bet koku nukleofilu, įskaitant sulfhidrilo grupes ant baltymų ir azoto donorų atomus nukleino rūgštyse. Cisplatina jungiasi su N7 arba O6 purino bazės azoto atomu ir dėl to gali sukelti DNR pažeidimą (dėl kurio gali būti suaktyvinamas p53) vėžio ląstelėse, blokuodama ląstelių dalinimąsi ir sukeldama apoptozinę ląstelių mirtį (Dasari and Bernard Tchounwou 2014b). Tačiau 2016 m. nustatyta, kad cisplatinos efektyvumą bei įgyjamą jai atsparumą sąlygoja auglio mikroaplinka, būtent su vėžiu susiję fibroblastai (CAFs), kuriuose padidėja tiolių metabolizmas (dėl ko surišamos cisplatinos molekulės ir apsaugomos giliau esančios vėžinės ląstelės), taip pat DNR pažeidimų taisymo mechanizmų (BRCA1/2) atstatymas (Rottenberg, Disler, and Perego 2021).

Cisplatinai patekus į kraujotaką, didžioji dalis platinos (65 – 98 %) sureaguoja su baltymais, ypač hemoglobinu, albuminu ir transferinu. Plaučių vėžio gydymui cisplatina įvairiuose deriniuose su kitais vaistais naudojama nuo 60 iki 100 mg/m² vienkartinio intraveninio dozavimu (Hesketh et al.

1993). Žmogaus kūno paviršiaus plotas yra nuo 1,6 iki 1,8 m². Žinant, kad žmogus turi apie 5 litrus kraujo, mūsų skaičiavimu 7,5-90 μM koncentracija atitiktų terapinę cisplatinos koncentraciją kraujyje, todėl tokias ribas daugelis mokslininkų ir naudoja savo tyrimuose su vėžinėmis ląstelėmis.

Kai genomo tikrinimo metu neaptinkamos specifinės mutacijos, į kurias galėtų būti nukreiptas pažangesnis priešvėžinis gydymas, chemoterapija platinos pagrindu išlieka vienu pagrindinių gydymo būdų ir šiais laikais. Alkilindami daugybę taikinių ląstelių viduje, šie vaistai sukelia vėžio ląstelių apoptozę; tačiau sunkūs inkstų sutrikimai, alerginės reakcijos, susilpnėjęs imunitetas, virškinimo trakto sutrikimai, kraujavimas ir klausos praradimas yra neigiamas cisplatinos poveikis (Dasari and Bernard Tchounwou 2014b) (Manohar and Leung 2018b). Nors klinikiniai tyrimai parodė, kad natrio tiosulfatas gali apsaugoti nuo klausos praradimo (Freyer et al. 2017), kai kurios vėžio ląstelės išvengia platinos junginių sukeltos apoptozės, todėl atsiranda atsparumas ir, deja, liga atsinaujina.

1.9.2. Paklitakselis

Paklitakselis priklauso diterpenoidiniams junginiams, o pagrindinis natūralus jo šaltinis yra kukmedžio žievė. 1992, 1994 ir 1998 metais jis buvo patvirtintas JAV maisto ir vaistų administracijos kaip vaistas nuo kiaušidžių, krūties ir nesmulkiaštelinio plaučių vėžio (Ojima et al. 2016; Du 2018a).

Paklitakselis daugiausia naudojamas kiaušidžių ir krūties vėžiui gydyti. Jo mechanizmas apima poveikį ląstelių mikrovamzdeliams/tubulinui (dėl mikrovamzdelių depolimerizacijos slopinimo atsiranda nenormalus mikrovamzdelių pluošto išdėstymas ir verpstė praranda normalią funkciją, taip sukeldama programuotą ląstelių žūtį). Paklitakselis žymiai padidina vėžinių ląstelių jautrumą radioterapijai, blokuodamas ląstelių ciklą G2 ir M stadijose (Du 2018b).

1.9.3. Docetakselis

Docetakselis yra pusiau sintetinis vaistas, priklausantis antineoplastinių vaistų grupei antimetabolitams. Palyginti su neapdorotais taksanais ir paklitakselio ekstraktais, docetakselis yra veiksmingesnis produktas prieš navikines ląsteles. Docetakselis yra naudojamas smegenų, prostatos, kiaušidžių, krūties, smulkiašteliniam plaučių, galvos/kaklo ir nesmulkiašteliniam plaučių vėžiui gydyti. Jį 1996 m. patvirtino JAV maisto ir vaistų administracija.

Docetakselio apoptozinis poveikis pasireiškia įvairiais mechanizmais, tokiais kaip: slopina IL-8 (interleukino) geno ekspresiją, sukelia centrosomų pažeidimus ir blokuoja antiapoptozinį baltymą Bcl-2. Docetakselis sukelia apoptozę, slopindamas tam tikras mitozinių ląstelių dalijimosi anafazės ir metafazės stadijas, veikdamas kaip mikrovamzdelių stabilizatorius (Thotakura et al. 2018).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Darbe tirtos žmogaus plaučių vėžio pirminės ląstelių linijos (bioetikos leidimas nr. 158200-18/5-1024-53), triušio raumens kamieninių ląstelių linija Myo9, komercinės K562 (ūmios leukemijos), A549 (nesmulkialąstelinės plaučių adenokarcinomos) ląstelių linijos. Ląstelių auginimui ir persėjimui buvo naudotos šios medžiagos: IMDM terpė (angl. *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) – Iskovo modifikuota Dalbeko terpė (*Gibco Life Technologies*), CO₂-nepriklausoma terpė (*Gibco*), FBS (angl. *foetal bovine serum*) – fetalinis jaučio serumas (*Gibco*), streptomicino-penicilino-nistatino (kuris sudarytas iš 10000 U/mL penicilino, 10 mg/mL streptomicino, 10000 U/mL nistatino ir 0,9 % NaCl) mišinys (*Thermo Fisher, Corning*), PBS (angl. *phosphate-buffered saline*) – fosfatinis buferinis tirpalas (*Carl Roth*), Tripsino/EDTA tirpalas (*Gibco Life Technologies*). Gyvybingumui matuoti naudota MTT – 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio bromidas (*Sigma-Aldrich*).

Ląstelių lizavimas atliktas naudojant šias medžiagas ir tirpalus: lizės buferis (sudarytas iš 50 mM Tris HCl (pH7,4), 50 mM NaCl, 5 mM NaF, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100), 10 µg/mL aprotininas (*Sigma-Aldrich*), 1 mM PMSF (angl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) – fenilmetilsulfonylo fluoridas (*Sigma-Aldrich*), 2 mM Na₃VO₄ (baltymų fosfatazių slopiklis) (*Sigma-Aldrich*); pavyzdžio buferis 4x (0,25M TrisHCl pH 6,8, 10% SDS, 0,01% Bromfenolio mėlio, 40 % glicerolio, 5 % MET). Branduolių išskyrimui naudotas rinkinys NUC-101 (*Sigma Aldrich*).

SDS-PAGE elektroforezė atliekama naudojant šias medžiagas: vandeninis akrilamido/bis-akrilamido tirpalas (sudarytas iš 29 % akrilamido, 1 % bis-akrilamido), TrisHCl/SDS tirpalas (sudarytas iš 1,5 M Tris HCl pH 8,8 %, 0,4 % SDS), TrisHCl/SDS tirpalas (sudarytas iš 0,5 M Tris HCl pH 6,8, 0,4 % SDS), elektroforezės buferis (sudarytas iš 25 mM bazinio Tris, 192 mM glicino, 0,1 % SDS ištirpintų vandenyje), amonio persulfatas ((NH₄)₂S₂O₈) 10 %, TEMED– tetrametiletildiaminas. Pernašai ant PVDF membranos (*Carl Roth*) naudotas Power blot pernašos buferis (*Thermo Fisher, Pierce, Invitrogen*). Gelio dažymui naudoti skirtingi dažai, įskaitant Page Blue, Gel Code, Imperial, Silver stain (*Thermo Fisher*). Baltymų koncentracijos matavimui ir suliginimui serijose naudotas Bradford reagentas (*Sigma*).

Western blot'ams naudotos medžiagos: nuplovimo tirpalas (sudarytas iš 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20), Roti-Block blokavimo

tirpalas (*Carl Roth*), ECL reagentas Clarity (*Bio Rad*). Pirminiai anti-fosfo antikūnai: pT308 Akt (*Cell Signaling*, #2965), pT202-pY204/pT185-pY187 ERK1/2 (*Santa Cruz* #sc-16982-R), pY397 FAK (*Invitrogen* #44-624G), pT180/pY182 p38 α (*Thermo Scientific* MA5-15177), pT183/pY185 JNK (*BD* #612540), pS63 c-Jun (*BD* #558036). Antikūnai prieš bendrą konkretų baltymą: anti-ERK2 (*Santa Cruz* #sc-1647), anti-c-Jun (*BD* #610326), anti-pan-AKT (*Invitrogen* #44-609G), anti-p38 (*SantaCruz* #sc-7972), anti-JNK (*SantaCruz* #sc-7345). Su HRP fermentu konjuguoti antriniai triušio ir pelės antikūnai (*Bio Rad* #1721011 ir #1706515). Tėkmės citometrijai naudoti antikūnai išvardinti lentelėje M1.

Priešvėžiniai vaistai: cisplatina (*Sigma-Aldrich*), paklitakselis (*Sigma-Aldrich*), docetakselis (*Sigma-Aldrich*), MEK slopikliai selumetinibas (*Sigma-Aldrich*), trametinibas (*Sigma-Aldrich*), PI3K slopiklis idelalisibas (*Sigma-Aldrich*), AKT slopiklis kapivasertibas (*Caymanchem*); taip pat ne vaistai, bet irgi slopikliai: PD98059 (MEK) (*Sigma-Aldrich*), LY294002 (PI3K) (*Sigma-Aldrich*), AKT inhibitor VIII (*Merck*), SCH772984 (ERK) (*Caymanchem*), SB203580 (p38) (*Caymanchem*), SP600125 (JNK) (*Alpha Aesar*).

Realaus laiko polimerazės grandininėi reakcijai naudoti pradmenys išvardinti lentelėje M2.

M1 lentelė:

Antigenas	Antikūnas	Izotipas	Klonas	Gamintojas
Sialoglycoprotein	CD24-PE	IgG1	eBioSN3	eBioscience/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Hyaluronic acid receptor	CD44-FITC	IgG2b	C-26	BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA)
Intercellular Adhesion Molecule1 (ICAM-1)	CD54-APC	IgG1	51-10C9	BD Pharmingen
Neural cell adhesion molecule (NCAM)	CD56-APC	IgG1	TULY56	eBioscience/Invitrogen
Thy-1 membrane glycoprotein	CD90-PE	IgG1	eBio5E10	eBioscience/Invitrogen
Growth factor receptor tyrosine-protein kinase c-KIT	CD117-APC	IgG1	104D2	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Glycoprotein prominin-1	CD133-APC	IgG1	W6B3C1	BD Pharmingen

Antigenas	Antikūnas	Izotipas	Klonas	Gamintojas
Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)	CD166-PE	IgG1	3A6	BioLegend
Epithelial cadherin (E-cadherin)	CD324-PE	IgG1	67A4	BD Pharmingen
Neural cadherin (N-cadherin)	CD325-APC	IgG1	8C11	BioLegend
Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)	CD326-FITC	IgG1	VU-109	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Human epidermal growth factor receptor 3 ERBB3/HER3	HER3-PE	IgG1	–	Miltenyi Biotech (Bergisch Glabach, Germany)
Isotype control-PE	IgG1	–	–	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)
Isotype control-APC	IgG1	–	–	Santa Cruz Biotechnology
Isotype control-FITC	IgG2b	–	–	Invitrogen
Isotype control-FITC	IgG1	–	–	Santa Cruz Biotechnology

M2 lentelė:

Genas	Pradmenys
<i>ABCG2</i>	F: TATAGCTCAGATCATTGTCCACAGTC R: GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG
<i>ALDH1</i>	F: GGGCAGCCATTTCTTCTCAC R: CTTCTTAGCCCCGCTCAACAC
<i>E-cadh</i>	F: TGAGTGTCCCCCGGTATCTT R: GAATCATAAGGCGGGGCTGT
<i>FOXC2</i>	F: CGCCCGAGAAGAAGATCACC R: CGCTCTTGATCACCACCTTC
<i>FOXQ1</i>	F: ACGCTGGCGGAGATCAACGAG R: AGGTTGTGGCGCACGGAGTT
<i>GAPDH</i>	F: AGTCCCTGCCACACTCAG R: TACTTTATTGATGGTACATGACAAGG
<i>HOXA5</i>	F: TTTTGCGGTCGCTATCC R: CTGAGATCCATGCCATTGTAG
<i>MYC</i>	F: CAGCGACTCTGAGGAGGAAC R: GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT

Genas	Pradmenys
<i>N-cadh</i>	F: TGCGGTACAGTGTAAGTGGG R: GAAACCGGGCTATCTGCTCG
<i>NANOG</i>	F: AGATGCCTCACACGGAGACT R: GTTTGCCTTTGGGACTGGTG
<i>OCT4</i>	F: CGAGAAGGATGTGGTCCGAG R: CAGAGGAAAGGACACTGGTC
<i>SOX2</i>	F: TGGACAGTTACGCGCACAT R: CGAGTAGGACATGCTGTAGGT
<i>SOX9</i>	F: GAGGAAGTCGGTGAAGAACG R: ATCGAAGGTCTCGATGTTGG
<i>SNAIL1</i>	F: CCAGACCCACTCAGATGTCAAGAA R: GGCAGAGGACACAGAACCAGAAAA
<i>SNAIL2</i>	F: GGCAAGGCGTTTTCCAGAC R: GCTCTGTTGCAGTGAGGGC
<i>SYK</i>	F: ACTTGGTCAGCGGGTGGAAAT R: GGGTGCAAGTTCTGGCTCAT
<i>TWIST1</i>	F: CCTTCTCGGTCTGGAGGAT R: TCCTTCTCTGGAACAATGACA
<i>TWIST2</i>	F: CGCAAGTGGAATTGGGATGC R: CGATGTCACTGCTGTCCCTT
<i>ZEB1</i>	F: GTTACCAGGGAGGAGCAGTGAAA R: GACAGCAGTGTCTTGTGTGTAGAAA
<i>ZEB2</i>	F: AGGAGCTGTCTCGCCTTG R: GGCAAAAGCATCTGGAGTTC

2.2. Tyrimams naudota aparatūra

Vertikalaus srauto laminaras (*Labguard Nuair*), termostatas su CO₂ ir O₂ kontrole (*AutoFlow Nuair*), termostatinė kratyklė (*ES-20/60, Biosan*), fluorescencinis mikroskopas su kamera (*EVOS FL Thermo Scientific*), elektroforezės pernašos aparatai (*Biometra; Thermo Fisher*), elektroforezės poliakrilamido gelio aparatas (*Invitrogen*), mikroplokštelių skaitytuvas *Varioskan flash (Thermo Scientific)*, šaldoma centrifuga Heraeus Fresco 21 (*Thermo Fisher*), ląstelių kiekio skaičiuotuvas *Cell counter TC10 (BioRad)*, termostatinė purtyklė (*TSC ThermoShaker, Biometra*), vartyklė (*Mini Rocker-Shaker, BioSan*), tėkmės citometras *FacsAria (BD)*, konfokalinis mikroskopas *LSM 710 (Carl Zeiss)*, bei PGR aparatas *RotorGene6000 (Corbett)*.

2.3. Metodai

2.3.1. Ląstelių linijos ir kultivavimas

Žmogaus nesmulkialąstelinės plaučių adenokarcinomos A549 ląstelės buvo įsigytos iš CLS (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Vokietija). K562 ląstelės gautos iš ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, JAV). Žmogaus pirminės plaučių vėžio ląstelių linijos išvestos panaudojant pooperacinę chirurginę medžiagą (regioninis bioetikos leidimas Nr. 158200-18/5-1024-537). Glaustai, plaučių navikų pavyzdžiai buvo susmulkinti mechaniškai, nuplauti PBS ir paveikti tripsino/EDTA tirpalu 30 min. 37 °C. Suvirškintas audinys buvo filtruojamas per ląstelių sietelį ir perkeltas į ląstelių kultūrų indą su Iskovo modifikuota Dalbeko terpe (IMDM), papildyta 10 % serumu FBS ir antibiotikais. Ląstelių linijų gavimo ir auginimo in vitro metu buvo naudojami įvairūs serumai, buvo keičiamas ląstelių kultūros tankis ir kiti parametrai. Kaip normalių / sveikų kamieninių ląstelių kontrolė naudota triušio raumens kilmės ląstelių linija Myo. Ji buvo sukurta Biochemijos institute (Lietuva) iš suaugusio triušio priekinio blauzdikaulio šlaunies raumens. Myo ląstelių kamieninė prigimtis buvo patvirtinta kamieninių ląstelių žymenų raiška, neribotu proliferacijos potencialu ir geba diferencijuotis įvairiomis kryptimis in vitro, kaip aprašyta (Kalvelytė et al, 2013). Ląstelių linijų charakterizavimas ir tyrimai buvo atliekami suvienodintomis sąlygomis. Adhezinių ląstelių kultūros auginamos IMDM terpėje su antibiotikais ir 10% serumo, CO₂ termostate 37°C temperatūroje, esant 85% santykiniam drėgnumui bei 5% CO₂, T25 “tissue culture-treated” flakonuose arba plokštelėse. Terpė pakeičiama kartu persėjant ląsteles, 1-2 kartus per savaitę. Ląstelių monosluoksnis lėkštelėje praplaunamas 2 mL PBS tirpalu, vėliau užpilant 1 mL tripsino-EDTA tirpalu ir inkubuojama 5-10 min CO₂ inkubatoriuje, kad suirtų užląsteliniai kontaktai ir ląstelės atkibtų nuo paviršiaus. 15 µL išpipetuotos suspensijos perkeliama į skaičiavimo kamerą, ląstelės suskaičiuojamos ląstelių skaičiuotuvu du kartus. Likusios ląstelės užpilamos 5 mL paruoštos IMDM auginimo terpės, ir resuspenduojamos. Reikiamas ląstelių kiekis paimamas tolimesniems eksperimentams, likęs ląstelių kiekis paliekamas lėkštelėje augti tolimesniems darbams.

Ląstelių tyrimams suspensijoje naudota termostatuojama kratyklė Biosan ES-20/60, kurios orbitinė kratymo amplitudė yra 2 cm, o dažnis 90 aps./min. Kad ląstelės nepriliptų prie indų sienelių, tripsino/EDTA tirpalu atskirtos ląstelės buvo patalpintos į nelimpančius ląstelių kultūrų indus („tissue culture non-treated“), T25/T75 flakonėliui imant 5/15 mL (atitinkamai) nuo CO₂ nepriklausomos augimo terpės (Gibco), praturtintos

glutaminu, serumu ir antibiotikais. Siekiant imituoti nuo prisitvirtinimo nepriklausomą cirkuliuojančių ląstelių būseną, eksperimentų metu ląstelės buvo laikomos suspensijoje 24-72 valandas. Atliekant tolesnius eksperimentus, suspensija buvo frakcionuojama į pavienių ir agreguotų ląstelių frakcijas natūralios sedimentacijos būdu (1 val. vertikaliame 15 ml mėgintuvėlyje 37 °C temperatūroje). Pavienės ląstelės buvo koncentruotos centrifuguojant, resuspenduotos šviežioje CO₂ terpėje ir perkeltos į neapdorotas 12 duobučių lėkšteles slopiklių tyrimams. Ląstelių agregatai kratymo metu terpėje formavosi spontaniškai. Kratymo metodas buvo pasirinktas dėl to, kad Western blot tyrimams yra reikalingi dideli ląstelių/baltymo kiekiai, kuriuos užtikrinti (ypač suspensinių ląstelių atveju) gali tik dideli tūriai.

2.3.2. Tėkmės citometrija

Ląstelės, augintos standartiniuose flakonuose, atkabinamos tripsino/EDTA tirpalu, praplaunamos kambario temperatūroje 1% BSA/PBS, centrifuguojamos, tirpalas nusiurbiamas, kartojama 2 kartus. Tada ląstelės paskirstomos į tėkmės citometrijai skirtus mėgintuvėlius, nucentrifuguojamos 4°C, ant ląstelių užpilami antikūnais, konjuguotais su fluorescenciniais dažais PE, FITC ir APC iki 4°C atšaldytame 1% BSA/PBS buferyje. Analogiškai daroma su izotipinėmis kontrolėmis, konjuguotomis su tokiais pačiais dažais. Dažniausiai į vieną mėgintuvėlį buvo pilami 2 antikūnai, pažymėti skirtingais dažais. Spalvų kompensavimas atliekamas prieš pradėdant darbą, naudojant žymėtus rutuliukus. Inkubacija su antikūnais – 1 val. 4°C temperatūroje tamsoje. Vėliau į mėgintuvėlius užpilamas didesnis kiekis šalto 1% BSA/PBS, centrifuguojama, dar praplaunama 1% BSA/PBS ir vėl užpilama matavimui. Naudoti pirminiai antikūnai nurodyti M1 lentelėje.

Matuojamos pirmiausia izotipinės kontrolės, nustatomi reikalingi matavimo parametrai. Apibrėžiami tiriamų ląstelių ir priemaišų regionai, po to – ląstelių autofluorescencijos regionai kiekvienam tiriamam detektoriumi (kas laikoma tam antikūno izotipui/dažui neigiama zona), ir tada apibrėžiami tam izotipui/dažui teigiami regionai.

Rezultatai išreiškiami procentais nuo visų įvykių bei vidutiniu absoliutaus signalo stiprumu (MFI).

2.3.3. Gyvybingų ląstelių kiekio nustatymas MTT metodu /ALAMAR blue metodu

MTT metodas – tai ląstelių gyvybingumo vertinimas naudojant vandenyje tirpų ir membraną lengvai pereinantį 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,

5-difeniltetrazolio bromidą (geltonos spalvos), kuri gyvos ląstelės redukuoja, sudarant netirpius violetinės spalvos formazano kristalus. Šiuo metodu galima matuoti ląstelių dauginimosi greitį, vienodai išsėtoje plokštelėje skirtingais laiko tarpais dažant vis kitas duobutes, įskaitant ir nulinius taškus kaip pradinės atskaitos tašką. MTT redukcijos greitis proporcingas gyvų/gyvybingų ląstelių kiekiui. Proliferacijos tyrimams pradinis ląstelių tankis neturi viršyti 1/8 paviršiaus ploto (*confluence*); toksiškumo tyrimams pradinis tankis turi būti ne mažesnis kaip 1/2.

Ląstelės išsėjamos į 96 šulinėlių plokštelę. Po paros nuo kontrolinių ląstelių šulinėlių pašalinama augimo terpė, užpilama 100 µL 0,2 mg/mL MTT tirpalo/PBS ir inkubuojama 1,5 val. Po inkubacijos MTT tirpalas pašalinamas, šulinėliai lieka sausi. Likusiuose šulinėliuose yra pašalinama sena augimo terpė ir pridėdama nauja terpė su atitinkamais slopikliais ir chemoterapiniais vaistais. Poveikis paprastai trunka tris paras. Po trijų parų terpė yra pašalinama, užpilama 100 µL 0,2 mg/mL MTT tirpalo ir inkubuojama 1,5 val. Po inkubacijos MTT tirpalas pašalinamas.

Visi šulinėliai su violetiniais formazano kristalais yra užpilami 96 % denatūruotu etanoliu, plokštelė atsargiai kratoma, kad ištirptų visi formazano kristalai. Matuojama 570 nm bangos ilgio šviesos sugertis. Gauti spektrofotometriniai duomenys parodo formazano koncentraciją, kuri yra proporcinga gyvybingų ląstelių kiekiui. Duomenys apdorojami, skaičiuojant santykį su nuliniiais taškais (jų vidurkiu, N ne mažiau 4).

Alamar blue metodas naudojamas tiek prilipusioms, tiek suspensinėms ląstelėms, ir yra jautresnis nei MTT, nes matuojama fluorescencija (ex 540 nm, em 590 nm). Taip pat, šis metodas patogesnis nei MTT, nes nereikia pašalinti senos terpės ir tirpinti netirpių reakcijos produktų.

2.3.4. Ląstelių žūties nustatymas fluorescenciniais dažais

Ląstelių gyvybingumas vertintas naudojant su DNR besijungiančių dažų mišinį: akridino oranžą (AO) – 1 mg/mL ir etidžio bromidą (EB) – 1 mg/mL (galutinė koncentracija ant ląstelių 10 µg/mL). Nudažytos prilipusios arba suspenduotos ląstelės analizuojamos fluorescenciniu mikroskopu. AO žaliai nudažo gyvų ir negyvų ląstelių branduolį ryškiai žalia spalva. EB jungia tik negyvas ląstelės, nes gyvų ląstelių membrana nepraleidžia šio dažo. EB nudažo branduolį oranžine, RNR – silpnai oranžine spalva. Tokiu būdu, negyvos ląstelės turi ryškiai oranžinį chromatiną. Taip nudažytų ląstelių kultūroje galima išskirti keturių rūšių ląsteles: 1) gyvas neapoptozines; 2) esančias ankstyvose apoptozės stadijose; 3) esančias vėlyvose apoptozės

stadijose; 4) nekrozines. Silpnai besidažančios, rudo atspalvio ląstelės, jei tokių randama, priskiriamos „šešėlių“, arba ląstelių be chromatinio, klasei.

2.3.5. Ląstelių lizavimas

Prieš pradėdant lizavimą, į paruoštą lizės buferį (10 mM TrisHCl pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM NaF; 1% detergento Triton X-100) šviežiai įpilama aprotinino, PMSF, Na₃VO₄. Pilnai paruoštas lizės buferis yra užpilamas ant ląstelių (200-300 μL) ir inkubuojama ant ledo 10 min. Naudojant grandiklį ląstelės atkabinamos nuo paviršiaus ir perkeliamos į 1,5 mL šaltus mikrocentrifuginius mėgintuvėlius, kurie vėliau centrifuguojami 20 min 20000 g jėga 4°C temperatūroje. Po centrifugavimo supernatantas perpilamas į kitus mėgintuvėlius, gerai išmaišomas, ir pamatuojama baltymo koncentracija, naudojant Bradford reagentą. Baltymų koncentracijos yra sulyginamos bandymo serijos viduje, nenustatinėjant tikslios koncentracijos. Elektroforezės lizatai sumaišomi su pavyzdžio buferiu ir 5 min. pakaitinami 95°C temperatūroje.

2.3.6. Branduolių išskyrimas ir lizavimas

Baltymų lokalizacijos tyrimams Western blot metodu pasirinkome NUC-101 reagentų rinkinį iš Sigma. Ląstelės po reikalingų poveikių 2 kartus nuplaunamos lediniu PBS tirpalu, TC25 flakonėliui imant po 5 mL PBS. Nusiurbus PBS, užpilamas Nuclei EZ Lysis tirpalas, 2 mL 25 cm² flakonui, ląstelės šiame buferyje perkeliamos į centrifuginį mėgintuvėlį, stipriai supurtomos ir paliekamos lede 5 min. Tada mėgintuvėlis centrifuguojamas 5 min. 500 g greičiu, supernatantas pašalinamas, o nuosėdos atsargiai resuspenduojamos 1 mL Nuclei EZ Lysis tirpalo, vėliau praskiedžiant iki 3 mL ir vėl paliekant 5 min. lede. Po pakartotinio centrifugavimo supernatantas pašalinamas, o branduoliai lizuojami ekstrakcijos buferiu (Triton X-100), kaip aprašyta lizatų Western blot tyrimams paruošimo atveju. 1 mln. branduolių imama 30 μL ekstrakcijos buferio. Lizatų serijos pavyzdžių baltymų koncentracija sulyginama Bradford metodu (590 nm bangos ilgio šviesos sugerties matavimas).

2.3.7. SDS-PAGE elektroforezė

Paruošus 10 arba 12% skiriamąjį gelio tirpalą, jis supilamas į gelio paruošimo gardelę, atliekama polimerizacija. Ant skysčio paviršiaus atsargiai yra užpilamas butanolio vandeninis tirpalas, kad poliakrilamido (PAA)

paviršius bŭtŭ lygus. Po polimerizacijos jis nupilamas, PAA gelio paviršius nuplaunamas dejonizuotu vandeniu. Paruošiamas 4% koncentruojantis gelis, jis užpilamas ant sustingusio skiriamojo gelio. Įdedamos reikiamo takelių kiekio “šukutės”. Elektroforezės buferį (25 mM Tris, 192 mM glicino, 0,1% SDS) supylus į elektroforezės aparatą, “šukutės” ištraukiamos. Į gelyje suformuotus šulinėlius pilama po 10-40 μL lizato. Įjungiamo elektros srovė, limituojant įtampą iki 100 V pradiniam etape (kol lizatas pereis koncentruojantį gelį), vėliau ribas padidinant iki 200 V, galios ribą paliekant 20 W. Po elektroforezės, didelio svorio (70+ kDa) baltymų PAA gelio dalis dažoma Coomassie dažų tirpalu pagal gamintojo rekomendacijas, o mažesnių baltymų gelio dalis elektros srove (1 A, 15 min) pusiau sausu būdu pernešama ant PVDF 0,45 μm membranos.

2.3.8. Imunoblotingo (*Western Blot*) metodas

Pirmiausia membrana 2 val. inkubuojama blokavimo tirpale. Vėliau ji paveikiama pirminiais antikūnais ir paliekama inkubuotis per naktį 4 °C. Po inkubacijos antikūnai pašalinami, o membrana 3 kartus praplaunama plovimo tirpalu. Užpilami su HRP fermentu konjuguoti antriniai antikūnai, su kuriais membrana inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po šios inkubacijos membrana vėl praplaunama. Signalas registruojamas sustiprintos chemiluminescencijos (ECL) metodu, nuotraukos apdorojamos ir analizuojamos kompiuterinėmis programomis (Visiolite, ImageJ, Ulead Photo Express, Powerpoint). Baltymo kiekio kontrole, greta validavimo su bendrais/nefosfo antikūnais, pasirinkome viso (bendro, totalinio) baltymo elektroforezės gelyje dažymą, kaip vis labiau rekomenduojamą ir plačiai naudojamą alternatyvą (argumentai išdėstyti pateiktose publikacijose: (Pillai-Kastoori, Schutz-Geschwender, and Harford 2020; Kirshner and Gibbs 2018; Welinder and Ekblad 2011; Moritz 2017).

2.3.9. Imunofluorescencinis metodas

Adhezinės ląstelės auginamos plokštelėse su stikliukais šulinėlio dugne. Po poveikių ląstelės plaunamos PBS, fiksuojamos 4% paraformaldehidu 15 min., tada dar kartą plaunamos PBS. Vėliau jos permeabilizuojamos 0,2% Triton X-100 tirpalu, paruoštu PBS'e, plaunamos 1% BSA/PBS tirpalu ir 1 val. blokuojamos 1% BSA, 10% asilo serumu/PBS 30 min. 37 °C. Po to veikiamos pirminiais antikūnais (10% asilo serumas/1% BSA/PBS tirpale) 60 min., 37 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos 1% BSA/PBS ir inkubuojamos su antriniais antikūnais, konjuguotais su FITC arba TRITC (10% asilo

serumas/1% BSA/PBS tirpale) 30 min. 37 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos 1% BSA/PBS. Dengiamieji stikliukai dėti ant objektinių stikliukų ląstelėmis žemyn į montажinę terpę Fluoroshield (Sigma), pavyzdžiai analizuoti fluorescenciniu mikroskopu. Suspensinės (K562) ląstelės tirtos analogiškai, tik pirmame etape jos buvo imobilizuojamos ant stikliuko.

2.3.10. Konfokalinė mikroskopija

KFM naudojama tikslesniam nei imunocitochemijos metodu tiriamo antigeno lokalizacijos nustatymui, nes gaunamas vaizdas yra tarsi ląstelės pjūvis, eliminuojantis signalus iš ląstelės tūrio, esančio aukščiau ir žemiau tiriamos plokštumos. KFM buvo atliekama naudojant Zeiss LSM710 konfokalinį mikroskopą ir šiuos nustatymus: sužadinantys lazeriai 488 nm ir 561 nm ir atitinkamus dichroinius filtrus (pagal tiriamo antikūno fluorescencinę žymę), naudojant 2 % šviesos intensyvumą; detektoriaus jautrumas 400-900; objektyvas 63x/1.4 NA; skenavimo lauko dydis 512x512 pikselių; vidurkinimas 4x. Preparatai KFM buvo paruošti naudojant tą patį protokolą, kaip ir aukščiau aprašytame imunocitocheminiame metode. Vaizdai gauti ir apdoroti Zen 2011 (Zeiss) programa.

2.3.11. Kiekybinės PGR metodas

RNR skyrimas atliekamas Trizol reagentu (Invitrogen, JAV), remiantis gamintojo instrukcija.

Išskirta RNR išvaloma nuo DNR priemaišų, naudojantis rinkiniu „DNase I, RNase-free“ (Thermo Fisher Scientific, JAV), pagal gamintojo protokolą: 0,5 µg išskirtos RNR sumaišoma su 2 µL DNaseI fermento 20-tyje µL reakcijos mišinio ir inkubuojama 37°C. Po inkubacijos DNaseI inaktyvuojama pridedant 2 µL 50 mM EDTA ir inkubuojant 5 min 65°C.

kDNR sintezė atliekama naudojant „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) rinkinį, pagal gamintojo protokolą. Pusė su DNaseI išvalytos RNR (10 µL) sumaišoma su 4 µL 5X Reaction Mix, 2 µL Maxima Enzyme Mix ir 4 µL vandens be nukleazų. Kiekvienam mėginiui sintetinama neigiama kontrolė be atvirkštinės transkriptazės. Mėginiai perkeliama į termociklerį „ARKTIC Thermal Cycler“ (FINNZYMES, Suomija), kuriame nustatoma programa: 10 min 25°C, 15 min 42°C, 5 min 85°C. Pasibaigus nustatytai programai, reakcijos produktas skiedžiamas 10 kartų vandeniui be nukleazų, taip paruošiant tolimesniam naudojimui.

kPGR atliekama naudojant „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) rinkinį. 2 μL paruošto kDNR mėginio sumaišoma su 5 μL „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)“, su 0,2 μL 10 μM tiesioginio ir atvirkštinio tiriamo geno sekai specifinių pradmenų bei su 2,6 μL vandens be nukleazių. kPGR vykdoma termocikleryje „Rotor-Gene™ 6000“ (Corbett Research, Australija), kuriame nustatoma programa 10 min 95°C ir 40 ciklų po 15 s 95°C, 30 s 56-60°C (priklausomai nuo pradmenų prigimties), 30 s 70°C. Gauti rezultatai apie kiekvieno ciklo metu nustatytą fluorescencijos intensyvumą pateikiami ir apdorojami programinėje įrangoje „Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7“. Santykinis genų raiškos pokyčių įvertinimas atliekamas taikant $\Delta\Delta\text{Ct}$ metodą, gautus rezultatus normalizuojant pagal namų ruošos geną GAPDH, o santykinę geno raišką apskaičiuojant pagal $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ formulę, kur $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}$ (tiriamo geno) – Ct (GAPDH), $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}$ (tiriamo geno) – ΔCt (kontrolinio geno), RQ (santykinė geno raiška) = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.3.12. Densitometrinė analizė

Western blot ir PAA gelių paveikslai importuojami į ImageJ programą, jų spalvos konvertuojamos į 16-bit spalvų paletę (Image>Type). Apibrėžus visus analizuojamus takelius į stačiakampį, naudojama funkcija Analyze>Gels>Select first lane, vėliau Plot lanes. Gautoje diagramoje rankiniu būdu (įrankis *Straight*) sudedamos atkarpos, atskiriančios pavienius elektroforezės takelius. Horizontaliai nubrėžiama tiesė, žemiau kurios lieka fono signalas. Tada, naudojant įrankį *Wand (tracing) tool* pažymimi kiekvieno takelio plotai, kas automatiškai yra paverčiama santykiniais intensyvumo vienetais. Gauti rezultatai normalizuojami pagal kiekio kontrolę, ir tada takeliai lyginami tarpusavyje.

2.3.13. Statistinė analizė

Duomenys diagramose išreiškiami kaip mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis \pm SD. Vidutinės imčių vertės buvo palygintos naudojant suporuotą (inhibitorinei analizei, poveikis/kontrolė) arba nesuporuotą t testą (*Graphpad* programinė įranga). Vertės buvo laikomos reikšmingai skirtingomis, kai $p < 0,05$. WB rezultatai pateikiami vienu atrinktu paveikslu iš ne mažiau kaip trijų eksperimentų, atspindinčių visų eksperimentų tendenciją.

3. REZULTATAI

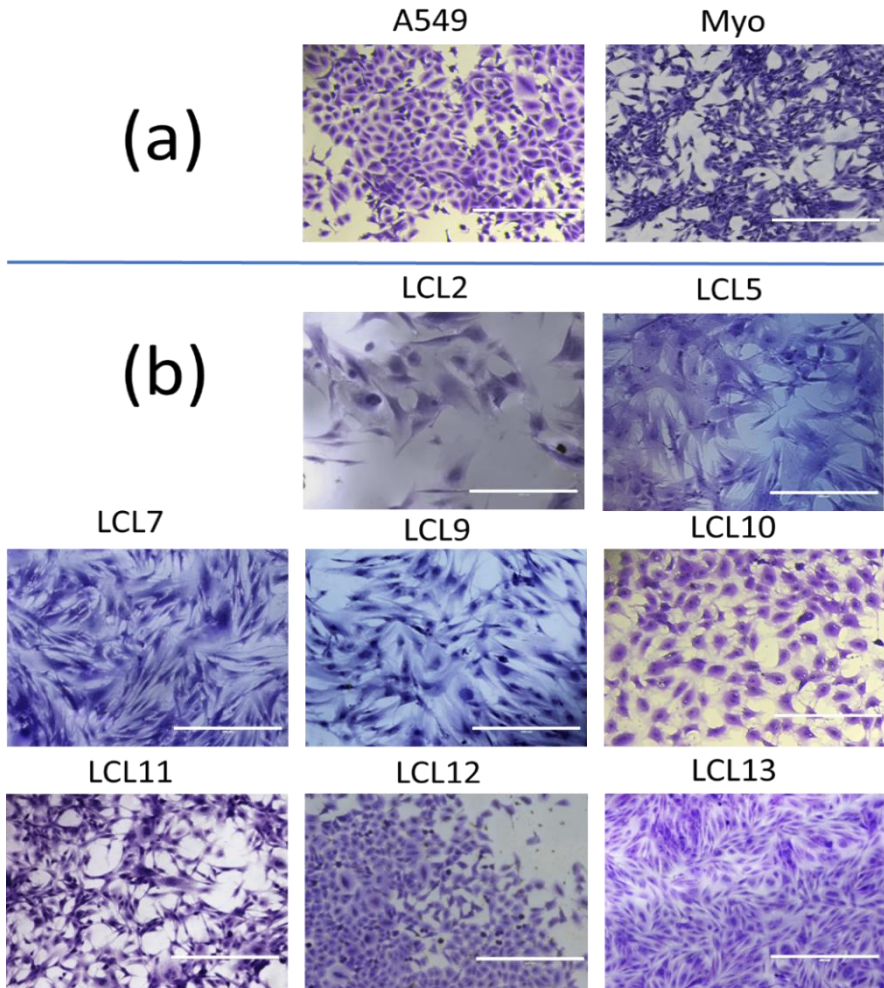
3.1. Užląstelinių kontaktų įtaka signalinių molekulių AKT, MAPK (ERK, JNK, p38), taip pat transkripcijos veiksnio cJun aktyvacijai skirtinguose ląstelių *in vitro* modeliuose

Pirmame tyrimų etape nagrinėta kaip proteinkinazių AKT, MAPK (ERK, JNK, p38), taip pat transkripcijos veiksnio cJun, aktyvacija skirtinguose ląstelių *in vitro* modeliuose priklauso nuo užląstelinių kontaktų.

Pagrindiniu tyrimo objektu pasirinkta nesmulkiąląstelinio plaučių vėžio adenokarcinomos ląstelių linija A549, kuri pasižymi tuo, kad ląstelėse yra nepakitęs vėžio supresorius TP53, ir mutuoatas *KRAS* genas, kuris didžiausia dalimi ir atsakingas už šių ląstelių piktybiškumą. Taip pat tirtos ir pirminės, fenotipiškai ir genotipiškai skirtingos, vėžinių ląstelių linijos, išvestos mūsų laboratorijoje anksčiau, be genetinio charakterizavimo. Raumeninės kilmės Myo ląstelių linija buvo pasirinkta kaip sveikų (ne vėžinių) kamieninių ląstelių kontrolė, gebanti ir neribotai daugintis, ir diferencijuoti įvairiomis kryptimis, kaip parodyta ankstesniuose mūsų darbuose (Kalvelyte et al. 2013)(Krestnikova et al. 2015)(Stulpinas, Bironaitė, and Kalvelytė 2008).

Ląstelių charakterizavimas

Nuotraukose R1 pav. parodytas skirtingas šių ląstelių dydis ir epitelinis/fibroblastinis fenotipas.



R1 pav. Šiame tyrime naudotos ląstelių linijos. (a) Žmogaus nesmulkiąląstelinės plaučių karcinomos A549 ląstelių linija pasižymi epitelio fenotipu. Iš triušio raumenų gauta kamieninių ląstelių linija Myo atstovauja normalias (nevėžines) ląsteles. (b) Tyrime naudotos žmogaus plaučių vėžio kilmės pirminės ląstelių linijos (LCL, augintos in vitro daugiau negu 10 persėjimų). Ląstelių morfologija rodo epitelio tipo ir mezenchiminio tipo (fibroblastines) skirtingo dydžio ląsteles. Ląstelės nudažytos kristalvioleto dažais. Mastelis 400 μm . Kiekvienas skaičius žymi skirtingą ląstelių liniją. (Copyright © 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Tėkmės citometrijos metodu tirtose ląstelių linijose nustatyti skirtingo lygio plaučių vėžinių ląstelių kamieniškumo bei epitelinio-mezenchiminio perėjimo (EMT) žymenys (R1 lentelė).

%	CD24	CD44	CD54	CD56	CD90	CD117	CD133	CD166	CD324	CD325	CD326	HER3
A549	80.1	91	50.3	13	14.1	17.1	28.5	95.6	51.2	40.1	29.5	8.2
LCL2	2.6	93.7	64.2	5.6	91.3	9.8	13.8	62.6	1.8	31.8	0	0
LCL5	1	91.7	68.8	5.9	94.6	7.7	46.8	67.2	0	39.6	0	0
LCL7	0	92.9	72.5	8.1	90.9	-	21.2	72.6	0	51.8	0	0
LCL9	0	45.6	39.7	6.4	83.9	7.1	16.3	69.1	1.5	21.1	0	0
LCL10	4.1	1.8	52.1	40.2	49.5	23.1	67.5	3.5	3.8	94.7	0.8	0
LCL11	4	2.9	36.1	41.6	66.6	64.7	91.5	0	0	96.4	0	0
LCL12	96.8	94.6	31.1	16.7	1.7	27	41	97.4	95	47.6	44.5	69.4
LCL13	89.2	88	7.6	4.3	0	1.3	-	96.7	70.2	30	0.9	-

MFI	CD24	CD44	CD54	CD56	CD90	CD117	CD133	CD166	CD324	CD325	CD326	HER3
A549	1683	991	62	8	10	9	12	5463	832	24	36	29
LCL2	3	296	267	10	841	16	15	174	3	35	1	1
LCL5	13	2093	412	26	10,083	31	157	329	1	133	1	1
LCL7	1	2288	351	15	1906	-	41	438	1	137	1	1
LCL9	1	178	34	5	50,793	4	7	2352	11	7	1	1
LCL10	14	5	58	43	123	23	83	16	14	299	1	1
LCL11	42	25	132	147	401	216	443	0	26	851	15	1
LCL12	8630	1903	27	17	5	25	39	6070	826	57	49	224
LCL13	2678	3173	11	15	1	7	-	1289	272	102	2	-

R1 lentelė. Nesmulkiają ląstelinio plaučių vėžio ląstelių linijų charakterizavimas tėkmės citometrijos metodu. Pastaba: didesnio formato lentelė pateikiama prieduose, psl. 133. Viršuje – procentinė teigiamų pagal konkretų žymenį ląstelių išraiška populiacijoje; apačioje – vidutinė signalo vertė (median fluorescence intensity, MFI) tiriamoje ląstelių linijoje. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Taip pat buvo atlikta koreliacijos analizė visų žymenų, tirtų tėkmės citometrijos metodu (R2 lentelė). Į bendrinį „plaučių vėžio ląstelių“ rinkinį įėjo A549 bei LCL2-LCL13 linijos. Citometrijos matavimus bei koreliacijos analizę atliko dr. Aušra Ungurytė. Šio preliminaraus tyrimo duomenimis, labai tikėtina teigiama koreliacija šiose žymenų porose: CD56/CD117, CD44/CD166, CD117/CD133, CD24/CD324, CD56/CD325 bei CD133/CD325. Atvirkštinė reikšminga koreliacija pastebėta šiose porose: CD24/CD90 bei CD324/CD90.

	CD24	CD44	CD54	CD56	CD90	CD117	CD133	CD166	CD184	CD324	CD325	CD326
CD44	0,7324***	x										
CD54	ns	ns	x									
CD56	ns	ns	0,6862**	x								
CD90	0,7596***	ns	ns	ns	x							
CD117	ns	ns	0,7406***	0,9313***	ns	x						
CD133	ns	ns	0,6254**	0,807***	ns	0,8805***	x					
CD166	0,7671***	0,6719***	ns	ns	ns	ns	ns	x				
CD184	ns	ns	ns	0,6305**	ns	0,6064**	0,5769*	ns	x			
CD324	0,8983***	0,7036**	ns	ns	-0,7832***	ns	ns	0,7831***	ns	x		
CD325	ns	ns	0,6891**	0,8163***	ns	0,8886***	0,989***	ns	0,5559*	ns	x	
CD326	0,4875*	ns	ns	ns	-0,5619*	ns	ns	0,5074*	ns	0,6527**	ns	x
HER3	0,6835**	ns	ns	ns	-0,5519*	ns	ns	0,519*	ns	0,6842**	ns	0,605*

P-value summary:
 * - p < 0.05, ** - p < 0.01, *** - p < 0.001.

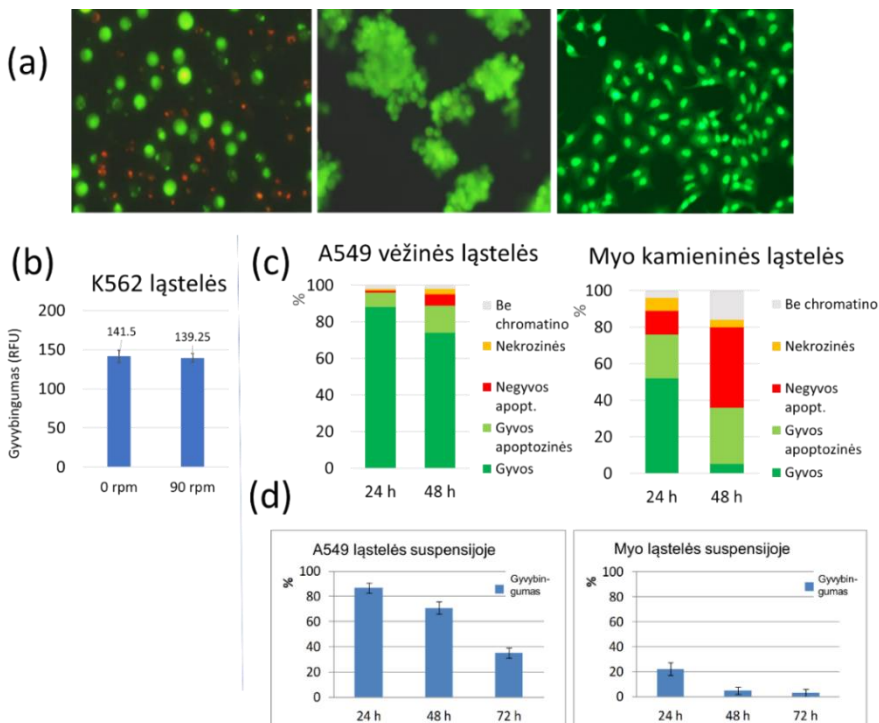
R2 lentelė. Koreliacinė ląstelinų žymenų analizė. Žaliai nuspalvotos poros, kurioms koreliacinis koeficientas didesnis už 0,8, o statistinis reikšmingumas $p < 0,001$.

Užląstelinių kontaktų modeliavimas, „nesvarumo būseną“

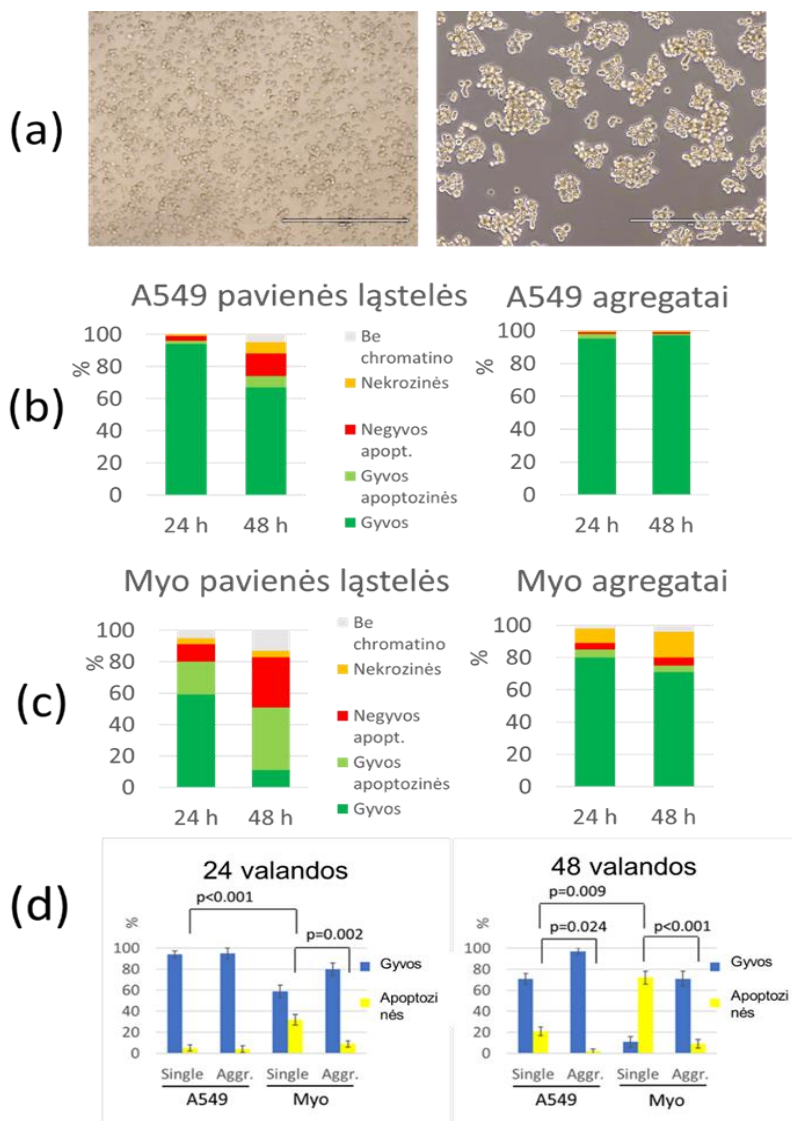
Tyrimams buvo pasirinkta schema, leidusi atskirti ir palyginti šias ląstelių būsenas, nulemtas skirtingų užląstelinių sąveikų: 1) prilipusias prie substrato – teigiama ląstelių sąveika su substratu, 2) pavienės suspensijoje – be jokių užląstelinių kontaktų, ir 3) agregavusias tarpusavyje ląsteles – sąveika tik tarp ląstelių (R2 pav. a). Skystyje plūduriuojančios ląstelės, indą nuolat kratant ir tokiu būdu neleidžiant susidaryti kontaktams ląstelė-substratas, gali būti apibūdintos kaip esančios nesvarumo, kritimo, ar plūduriavimo būsenoje, kuri yra nenatūrali adhezinėms ląstelėms. Taigi, įvairių slopiklių įtaka ląstelių gyvybingumui bei signalinių molekulių modifikacijos buvo tiriamos trijų būsenų ląstelėse.

Kaip žinoma, užląstelinius kontaktus praradusios ląstelės žūva apoptoziniu būdu, dar vadinamu *anoikis*. Išimtimi yra kraujo ląstelės, kurios natūraliai auga ir dauginasi suspensijoje. Patikrinę savo eksperimentines sąlygas su leukeminėmis (kraujo) ląstelėmis K562 bei parodę, kad šios bandymo sąlygos yra nekenksmingos suspensinėms ląstelėms (R2 pav. b), nustatėme, kad Myo ląstelės yra jautresnės kontaktų netekimui nei A549 ląstelės (pagal apoptozinę morfologiją bei membranos integralumą, naudojant AO/EB dažų mišinį) (R2 pav. c). Apoptozės patvirtinantys požymiai, tokie kaip DNR fragmentacija, kaspazės-3 skaldymas, mitochondrijų potencialo sumažėjimas, buvo nustatyti suspensinėse ląstelėse po 24 ir 48 val. (duomenys nepateikti).

Kita vertus, tarpląsteliniai kontaktai agregavusias ląsteles apsaugojo nuo žūties. Paveiksle R3 parodoma, kad tiek A549, tiek Myo agregatai suspensijoje išgyvena ilgiau nei pavienės suspensinės ląstelės. Darytina išvada, kad perdavime išgyvenimo signalų, kuriuos paprastai suteikia prilipimas prie paviršiaus, dalyvauja ir tarpląsteliniai kontaktai.



R2 pav. (a) Tyrimuose naudotų ląstelių sąveikos pavyzdžiai. Iš kairės: pavienės ląstelės suspensijoje (ląstelės be jokių tarpląstelinį kontaktų); ląstelės agregatuose (ląstelės, sudarančios tarpląstelinį kontaktus); ląstelės, prilipusios prie indo dugno (ląstelės, sudarančios ir tarpląstelinį kontaktus, ir kontaktus su substratu). Ląstelės buvo dažomos AO/EB dažais, kaip aprašyta metodikoje. (b) Leukeminių K562 ląstelių kratymas nesumažina jų gyvybingumo. Su nelimpančiomis žmogaus leukemijos K562 ląstelėmis buvo išbandytos kratymo sąlygos (90 aps./min. 48 val.). Kontrolinės ląstelės buvo laikomos statinėmis sąlygomis toje pačioje kratyklėje. Gyvybingumas matuotas rezazurino redukcijos metodu, RFU – santykiniai fluorescencijos vienetai. $N = 4$, skirtumas buvo nereikšmingas. (c) Substratinėms ląstelėms netekus tarpląstelinį ir su substratu kontaktų (ląstelės suspensijoje) pasireiškia apoptozinis ląstelių mirties būdas – anoikis. Ląstelių pasiskirstymas (%) pagal jų morfologiją, įvertintą AO/EB fluorescenciniu dažymu, kaip aprašyta metoduose. (d) Užląsteliniai kontaktai reikalingi A549 bei Myo ląstelių gyvybingumui palaikyti. A549 ląstelės daug atsparesnės kontaktų netekimui, lyginant su Myo ląstelėmis. Gyvybingumas, matuotas rezazurino redukcijos metodu, išreikštas procentais nuo reikšmės pradiniu (nuliniu) laiko momentu. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

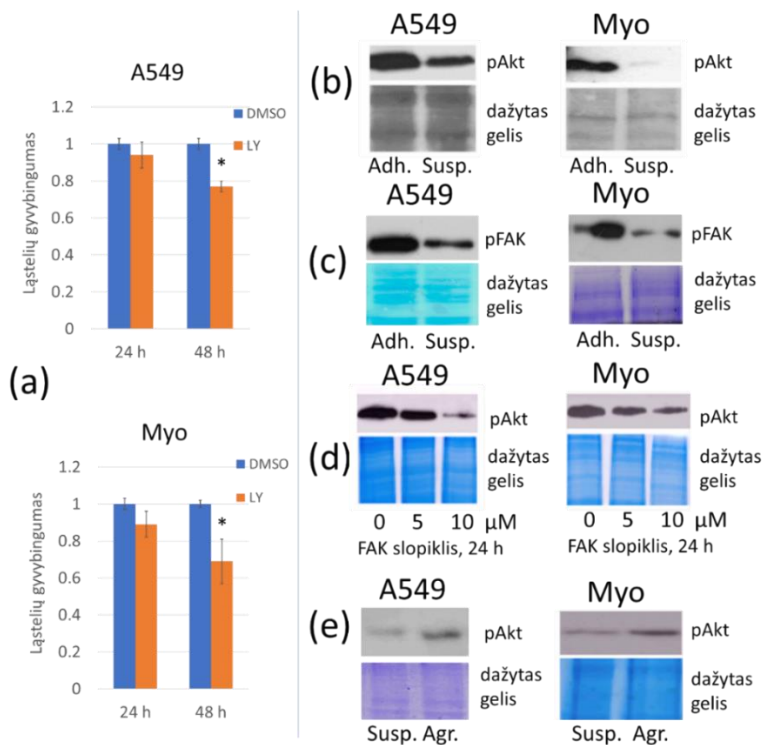


R3 pav. Tarpląstelinių kontaktų vaidmuo suspensijos sąlygomis augintų ląstelių gyvybingumui. (a) Pavienių ir agregavusių ląstelių suspensijoje pavyzdžiai. (b) A549 ląstelės agregatuose yra atsparesnės kontaktų su substratu praradimui nei pavienės ląstelės. (c) Myo kamieninės ląstelės agregatuose yra atsparesnės kontaktų su substratu praradimui nei pavienės ląstelės. Ląstelių pasiskirstymas (%) pagal jų morfologiją įvertintas AO/EB fluorescenciniu dažymu, kaip aprašyta metoduose. (d) Ląstelių gyvybingumo statistinė analizė 24 h ir 48 h. Apoptozė šiuo atveju apima ir gyvybingas apoptozines, ir negyvybingas apoptozines ląsteles kartu. P vertei apskaičiuoti naudotas nesuporuotas Stjudento t testas. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

AKT reguliacija per užląstelinius kontaktus

PI3K/AKT signalinis kelias dalyvauja ląstelių (tiek normalių, tiek vėžinių) dauginimesi, išgyvenime, migracijoje, epitelinio-mezenchiminio virsmo procesuose, naviko augime, invazijoje bei metastazavime. Tiek augimo veiksniai, tiek užląsteliniai kontaktai nuo ląstelės paviršiaus perduoda savo signalą per AKT. Išoriniai kontaktai aktyvuoja AKT ir tuo būdu palaiko ląstelę gyvą, ką ir parodėme ląsteles suspensijoje paveikę PI3K slopikliu LY294002. Kaip matyti paveiksle R4a, AKT slopinimas padidino tiek A549, tiek Myo ląstelių žūtį. Tokį pat efektą sukėlė ir kiti AKT signalinio kelio slopikliai (duomenys nepateikti). Taigi, AKT signalinis kelias dalyvauja apsaugant užląstelinių kontaktų netekusias ląsteles nuo žūties. Dar daugiau, suspensinėse ląstelėse AKT molekulės fosforilinimas T308 pozicijoje (čia ir žemiau visame darbe bus pateikiami tiksliai T308 pozicijos AKT fosforilinimo Western blotai) yra mažesnis nei prilipusiose, tiek A549, tiek Myo ląstelėse (pav. R4b). Analogiškai, ląstelių tarpusavio sąveikos agregatuose padidino AKT fosforilinimą, lyginant su suspensinėmis ląstelėmis.

Prilipimą prie paviršiaus sąlygoja integrinai. FAK – fokalinė prilipimo kinazė – yra signalinė molekulė integrinų signalo perdavimo kelyje, kurios fosforilinimas Y397 pozicijoje susijęs su molekulės aktyvumu. Mūsų tyrime, FAK fosforilinimas neprilipusiose ląstelėse buvo sumažėjęs (pav. R4d). Taipogi, prilipusiose ląstelėse FAK slopiklis PF573228 mažino AKT fosforilinimą (pav. R4e). Šie duomenys, taip pat ir duomenys (nepateikti) kad FAK slopiklis didino ląstelių žūtį, leidžia teigti, kad išgyvenimo signalinė molekulė kinazė AKT yra aktyvinama dalyvaujant integrinams ir FAK.



R4 pav. Užląsteliniai kontaktai dalyvauja AKT reguliacijoje. (a) PI3K/Akt kelio slopiklis LY294002 sumažina ląstelių, praradusių užląstelinius kontaktus, gyvybingumą. Po 24 val. kratymo agregatai buvo pašalinti. Likusios pavienės ląstelės paveiktos 10 μM LY294002 (LY) arba jo tirpikliu DMSO. Po 24 ir 48 val. ląstelių gyvybingumas buvo matuojamas resazurino redukcijos metodu. DMSO paveiktų ląstelių gyvybingumas normalizuotas iki 1,0. Žvaigždute pažymėtas reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$, $N = 3$). (b) Baltymų kinazės AKT fosforilinimas sumažėja ląstelėse, auginamose suspensijos sąlygomis, palyginti su prilipusiomis ląstelėmis. FAK dalyvauja A549 ir Myo ląstelių anoikis reguliavime. (c) FAK fosforilinimo sumažėjimas ląstelėse, auginamose suspensijoje 24 h. (d) FAK inhibitorius PF573228, esant nurodytoms koncentracijoms, sumažina AKT kinazės fosforilinimą A549 ir Myo ląstelėse. (e) Ląstelių agregatai pasižymi didesniu AKT fosforilinimo lygiu nei pavienės ląstelės suspensijoje. Po 24 val. inkubacijos su inhibitoriumi ląstelės buvo lizuotos. Pateiktos tipinės Western bloto nuotraukos, gautos naudojant antikūnus prieš aktyvuotas AKT ir FAK kinazių formas – anti-Akt-pT308 ir anti-FAK-pY397; Coomassie dažais nudažyti SDS-PAGE geliai naudojami kaip kiekio kontrolė. Adh. – prilipusios ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės suspensijoje, Aggr. – agregatai. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Kitos molekulės, susiję su *anoikis* reguliacija ląstelėse, yra MAPK šeimos baltymai, todėl tolimesni tyrimai buvo nukreipti į jas.

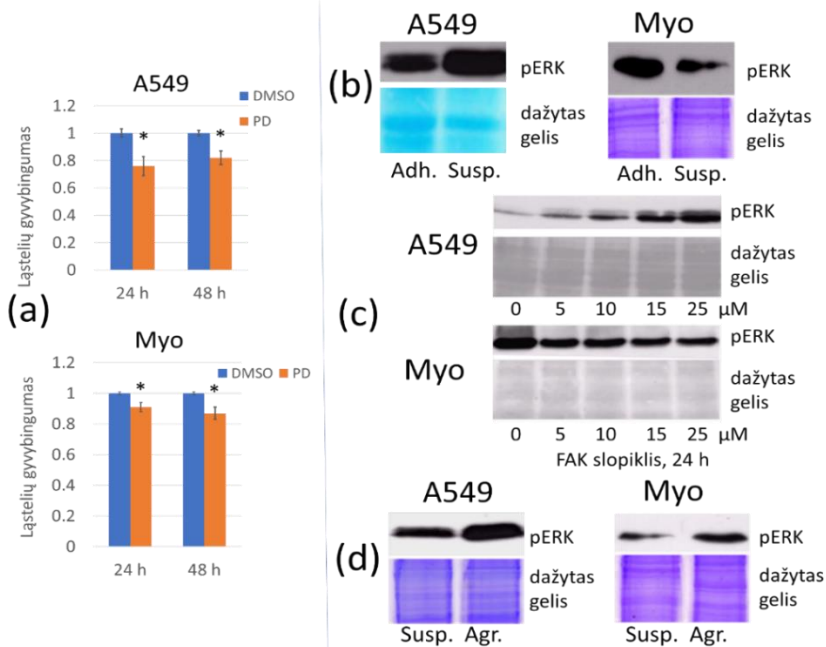
Užląsteliniai kontaktai reguliuoja ERK1/2 aktyvumą

MAPK ERK1/2 yra serino/treonino kinazė, atsakinga už įvairius ląstelinius procesus. ERK signalinis kelias susijęs su vėžinių ląstelių atsparumu apoptozei, taip pat, kartu su AKT, tai įprastos molekulės, per kurias perduodamas integrinų generuojamas išgyvenimo signalas. Tiek A549, tiek Myo ląstelių atvejais ERK apsaugo nuo *anoikis*, nes šio kelio slopikliai tokie kaip PD98059, selumetinib bei U0126 padidino žuvimo mastą (R5a pav. ir kiti, nepateikti duomenys)

Netikėtai, ERK fosforilinimo tyrimai atskleidė skirtumą tarp A549 ir Myo ląstelių: A549 ląstelėms netekus kontakto su substratu, ERK fosforilinimas padidėjo, tuo tarpu Myo ląstelėse sumažėjo, nors abiejose ląstelių linijose ši kinazė buvo antiapoptozinė (pav. R5b). Panašiai, FAK slopiklis ERK fosforilinimą mažino Myo atveju, bet didino A549 atveju (pav. R5c).

Kaip minėta pav. R3b,c, ląstelės agregatuose išliko ilgiau gyvos nei pavienės suspensijoje. Western blot metodu parodėme (pav. R5d), kad tarpląsteliniai kontaktai aktyvino ERK tiek vėžinių A549, tiek sveikų kamieninių Myo ląstelių agregatuose. Tai patvirtina, kad ERK1/2 yra antiapoptozinė molekulė: jos aktyvinimas apsaugo ląsteles nuo žūties.

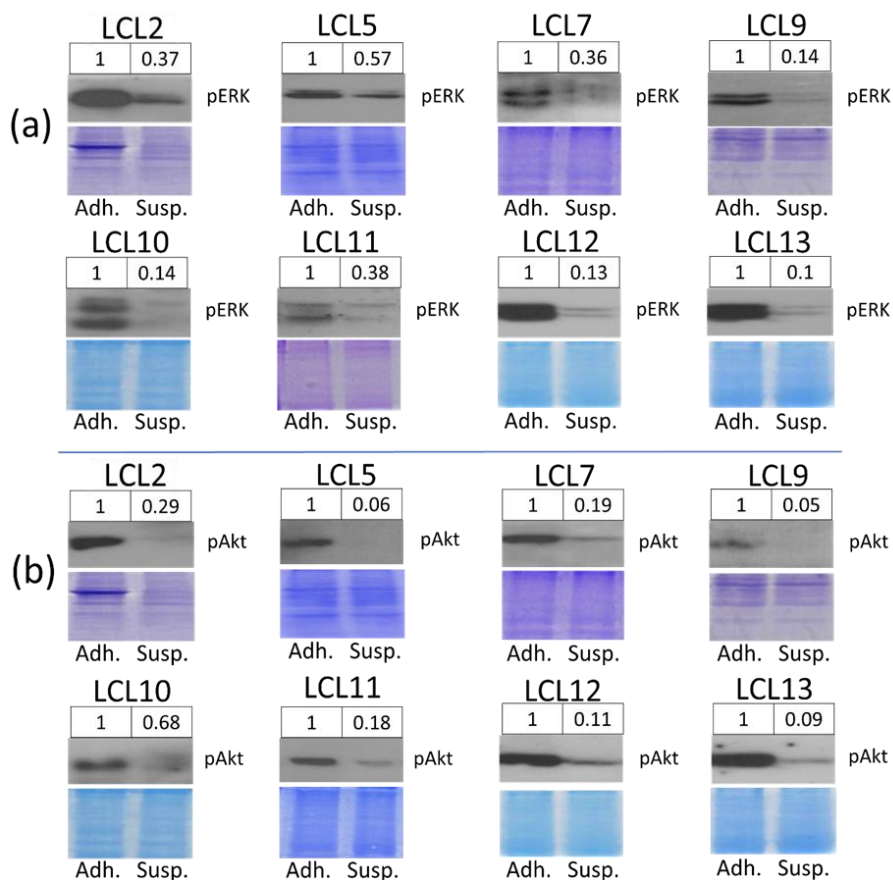
Remiantis gautais rezultatais, galime daryti išvadą, kad FAK, ERK1/2, ir AKT kinazės yra susijusios su vėžinių ir kamieninių ląstelių apsauga nuo žūties. Šių kinazių bazinis fosforilinimas priklauso nuo ląstelė-substratas kontaktų, tačiau individualiai/skirtingai.



R5 pav. (a) Užląstelinių kontaktų įtaka MAP kinazei ERK1/2. (a) MEK1/2 (MAPK ERK kelio) slopiklis PD98059 (PD) sumažina ląstelių, praradusių užląstelinius kontaktus, gyvybingumą. Po 24 val. kratymo ląstelių agregatai buvo pašalinti. Likusios pavienės ląstelės, augintos suspensijoje (pavienės ląstelės) 24 h, buvo paveiktos 20 μM PD98059. Ląstelių gyvybingumas buvo matuojamas resazurino redukcijos metodu po 24 ir 48 h. DMSO veikty ląstelių gyvybingumas buvo normalizuotas iki 1,0. Žvaigždute pažymėtas reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$, $N = 3$). (b) Ląstelių kontaktų su substratu praradimas priešingai reguliuoja ERK fosforilinimą A549 vėžio ir Myo kamieninėse ląstelėse. Baltymų kinazės ERK fosforilinimas padidėja atlipusiose A549 ląstelėse, lyginant su prilipusiomis ląstelėmis, bet sumažėja Myo ląstelių atveju. (c) FAK skirtingai dalyvauja ERK reguliavime A549 ir Myo ląstelėse. FAK slopiklis PF573228 padidina ERK fosforilinimą A549 ląstelėse, bet sumažina Myo kamieninėse ląstelėse. PF573228 (5-25 μM) buvo veikiamos prilipusios ląstelės. (d) Agregatuose esančių ląstelių ERK fosforilinimo lygis yra aukštesnis nei pavienių ląstelių suspensijoje. Po 24 val. inkubacijos ląstelės buvo lizuotos. Western bloto nuotraukos, gautos naudojant antikūnus prieš aktyvuotą ERK formą (pT202-pY204/pT185-pY187). Pateiktos reprezentatyvios nuotraukos; Coomassie briliantiniu mėliu nudažyti SDS-PAGE geliai naudojami kaip kiekio kontrolė. Adh. – prilipusios ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės suspensijoje, Agr. – agregatai. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

ERK ir AKT reguliavimas užląsteliniais kontaktais pirminėse linijose

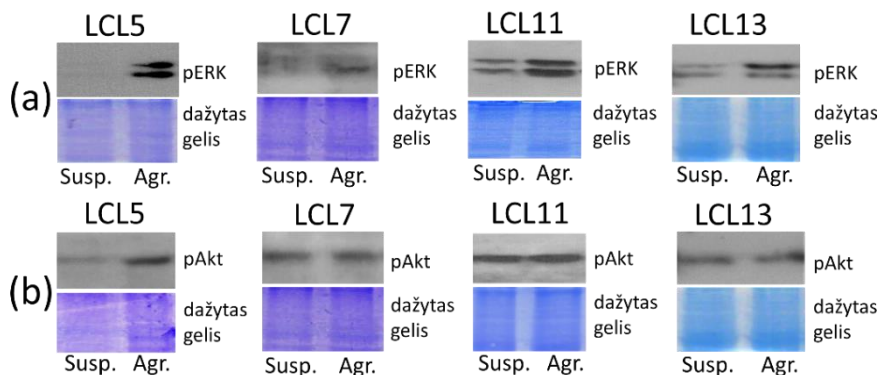
Tokie pat tyrimai atlikti siekiant nustatyti užląstelinių kontaktų poveikį kinazių fosforilinimui ląstelėse, gautose iš plaučių vėžio sergančių pacientų. Pirminėse plaučių vėžio kilmės ląstelių linijose parodėme, kad ERK ir AKT aktyvacija tikrai priklauso nuo ląstelė-substratas kontaktų: suspensinėse ląstelėse ERK ir AKT fosforilinimas sumažėja (R6 pav.).



R6 pav. Pirminės plaučių vėžio ląstelės suspensijoje praranda ERK1/2 (a) ir AKT (b) fosforilinimą. Skaičiai virš paveikslėlių rodo santykinį juostelės intensyvumą, normalizavus pagal visą baltymo kiekį elektroforezės gelyje. Adh. – adherentinės ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės, esančios suspensijoje 24 val. kratant. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Be to, gauti duomenys rodo, kad ląstelių agregatuose yra didesnis fosforilinto ERK kiekis nei suspenduotose ląstelėse (R7a pav.), o tai rodo, kad

ląstelė-ląstelė kontaktai padidina šios išgyvenimo kinazės fosforilinimą. Tuo tarpu reikšmingų AKT fosforilinimo skirtumų tarp agreguotų ir pavienių ląstelių suspensijoje nenustatėme (pav. R7b).

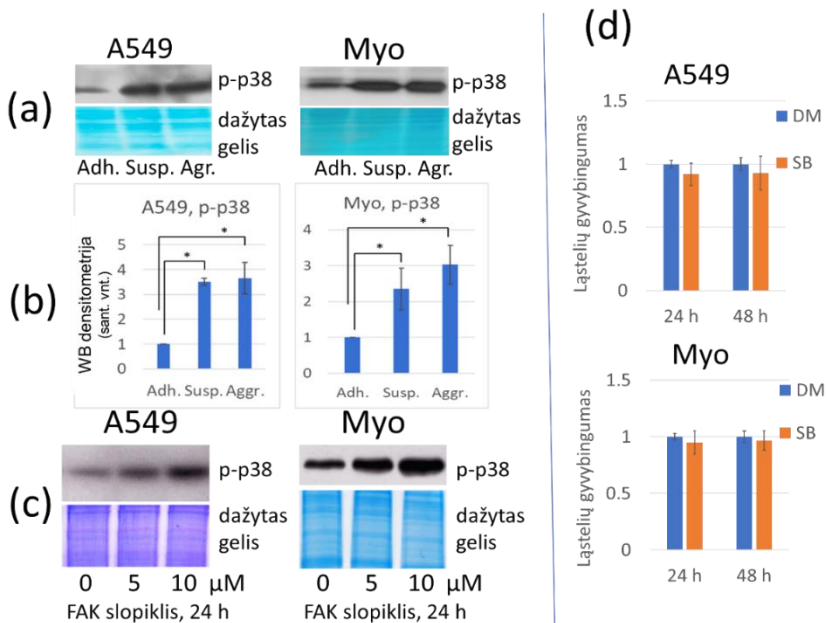


R7 pav. (a) ERK1/2 fosforilinimas pirminėse plaučių vėžio ląstelių linijose yra didesnis agregavusiose ląstelėse (tarpląsteliniai kontaktai) nei pavienėse ląstelėse suspensijoje (ląstelės be kontaktų). (b) AKT fosforilinimas pirminėse plaučių vėžio ląstelių linijose nelabai skiriasi tarp agreguotų ląstelių ir pavienių ląstelių suspensijoje. Ląstelės kratytos 24 val. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Užląsteliniai kontaktai ir streso kinazė p38

Kiti signaliniai keliai, dalyvaujantys ląstelių likimo reguliavime ir galintys perduoti signalus nuo integrinų ir kadherinų, yra streso kinazės JNK ir p38.

P38 fosforilinimo tyrimai parodė, kad atlipimas nuo paviršiaus aktyvavo p38 Myo ir A549 ląstelėse tiek pavienėse, tiek agregavusiose ląstelėse (pav. R8a,b). Toks pat efektas stebėtas ir paveikus prilipusias ląsteles FAK slopikliu (pav. R8c). Taigi, p38 yra fosforilinamas *anoikis* sąlygomis padidėja. Siekdami išsiaiškinti, ar mūsų modelinėse sistemose p38 yra pro ar antiapoptozinis, atkabintos ląstelės buvo inkubuojamos su p38 slopikliu SB203580. Tačiau patikimų skirtumų, lyginant su kontrole, negavome (pav. 8d), todėl gali būti, kad p38 šiame procese tiesioginio vaidmens neatlieka.



R8 pav. MAP kinazės p38 fosforilinimas priklauso nuo užląstelinių kontaktų. (a) Tiek A549, tiek Myo ląstelėse, esančiose suspensijoje ir agregatuose, p38 fosforilinimo lygis yra aukštesnis nei prilipusiose ląstelėse. (b). Densitometrinis fosfo-p38 baltymo kiekybinis įvertinimas, siekiant nustatyti skirtumus tarp prilipusių ląstelių ir ląstelių suspensijoje bei ląstelių agregatuose. Keturių nepriklausomų eksperimentų, atliktų tomis pačiomis sąlygomis, Western blo to juostų intensyvumas normalizuotas pagal atitinkamą bendrą baltymų kiekį tuose pačiuose takeliuose. Skirtumų statistinis reikšmingumas apskaičiuotas naudojant suporuotą Stjudento t-testą, lyginant Adh. su Susp. ir Adh. su Aggr. Nustatyta, kad jie yra reikšmingi ($N = 4$, $p < 0,05$, pažymėta žvaigždutėmis). (c) FAK inhibitorius PF573228 didina p38 fosforilinimą prilipusiose ląstelėse. Po 24 val. inkubacijos ląstelės buvo lizuotos. Western blo to nuotraukos gautos naudojant antikūnus prieš aktyvuotą p38 α formą (pT180/pY182). Parodytos reprezentatyvios Western blot nuotraukos; Coomassie mėlynu dažų nudažyti SDS-PAGE geliai atstoja kiekio kontrolę. Adh. – prilipusios ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės suspensijoje, Aggr. – ląstelės agregatuose. (d) p38 kinazės slopiklis SB203580 neatskleidė p38 vaidmens A549 ar Myo ląstelėse anoikis metu. Pavienės ląstelės suspensijoje buvo paveiktos 10 μ M SB203580 (SB) arba jo tirpikliu DMSO. Ląstelių gyvybingumas buvo matuojamas rezazurino redukcijos metodu po 24 ir 48 val.. DMSO paveiktų ląstelių gyvybingumas normalizuotas iki 1,0. Nė vienas iš skirtumų nebuvo reikšmingas ($p > 0,05$, $N > 7$). © 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

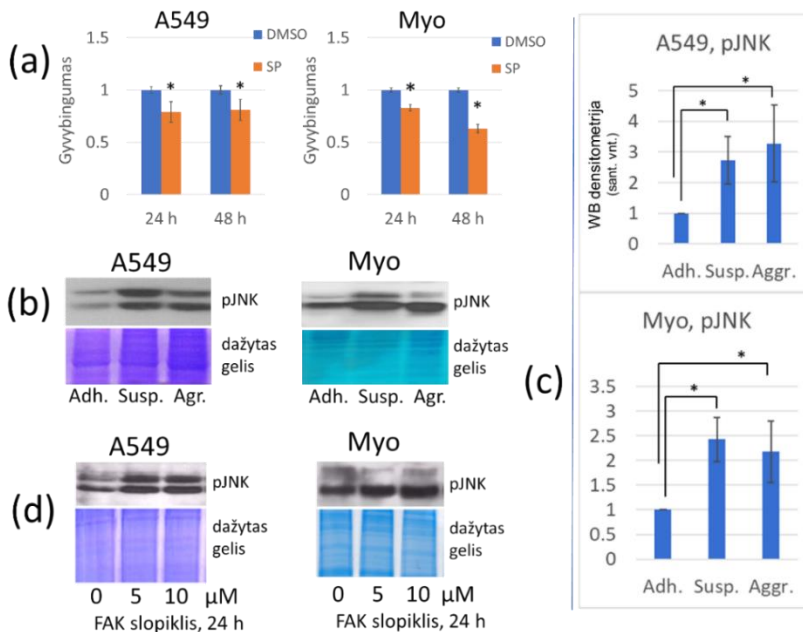
Užląsteliniai kontaktai reguliuoja JNK signalinį kelią

Literatūroje yra duomenų, kad JNK signalinis kelias gali dalyvauti *anoikis* reguliacijoje, ir kad JNK vaidmuo gali būti dvejopas: pro arba antiapoptozinis.

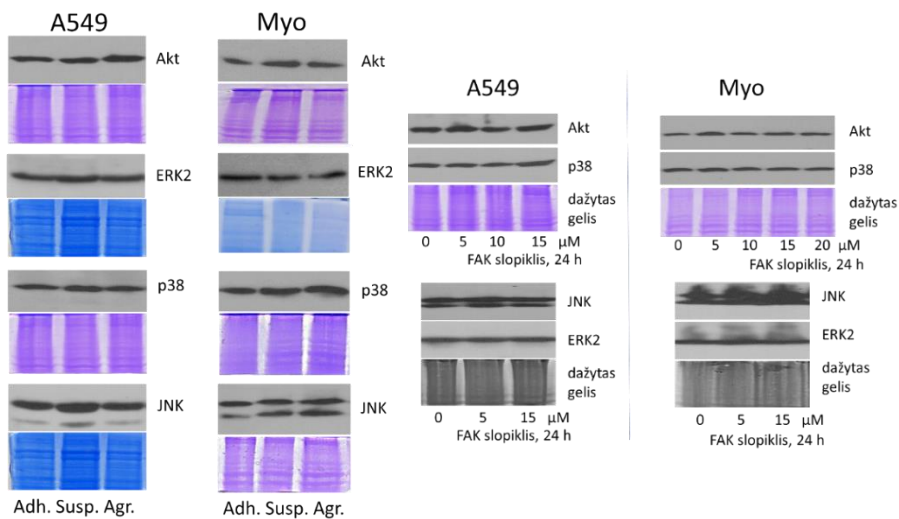
Mūsų tyrimai rodo, kad JNK kelias yra apsaugantis nuo žūtis: JNK savitas slopiklis SP600125 didino tiriamų ląstelių žūtį suspensijoje (pav. R9a). Western blot metodu nustatėme, kad JNK fosforilinimas neprilipusiose ląstelėse didesnis nei prilipusiose (pav. R9b,c). Taip pat, FAK slopiklis didino pJNK kiekį (pav. R9d). Taigi, *anoikis* metu JNK aktyvuojasi.

Taip pat parodėme, kad tirtuose ląstelių modeliuose kinta tik kinazių fosforilinimas, bet ne kinazės baltymo kiekis/raiška (R10 pav.).

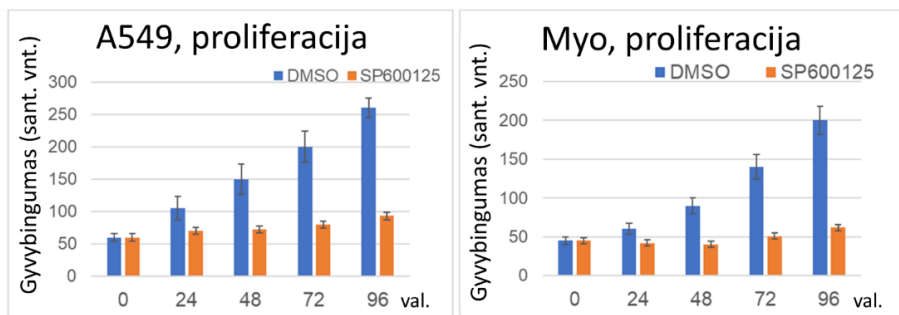
Šioje vietoje apibendrinant, abiejų streso kinazių (p38 ir JNK) aktyvinimas gali būti susijamas su ląstelė-substratas kontaktų netekimu tiek vėžinėse, tiek kamieninėse ląstelėse, tačiau jų vaidmuo žūtis signalo reguliavime gali būti nevienodas. Streso kinazė JNK dalyvauja apsaugant ląsteles nuo anoikio ir vienareikšmiškai yra reikalinga abiejų ląstelių linijų proliferacijai – slopiklis SP600125 (20 μ M) patikimai stabdė ląstelių dauginimąsi (R11 pav.).



R9 pav. Užląstelių kontaktų įtaka MAP kinazei JNK. (a) JNK slopiklis SP600125 (SP) sumažina Myo ir A549 ląstelių išgyvenamumą suspensijoje. Pavienės ląstelės suspensijoje buvo paveiktos 20 μM SP600125 arba jo tirpikliu DMSO. Ląstelių gyvybingumas išmatuotas rezazurino redukcijos metodu po 24 ir 48 val. DMSO veiktų ląstelių gyvybingumas normalizuotas iki 1,0. Žvaigždute pažymėtas reikšmingas skirtumas ($p < 0,05$, $N = 3$). (b) Tiek A549, tiek Myo ląstelėse, esančiose suspensijoje ir agregatuose, JNK fosforilinimo lygis yra aukštesnis nei prilipusiose ląstelėse. (c) Fosfo-JNK baltymo kiekybinis palyginimas, siekiant įvertinti skirtumus tarp prilipusių ląstelių ir ląstelių suspensijoje bei ląstelių agregatuose. Keturių nepriklausomų eksperimentų, atliktų tomis pačiomis sąlygomis, Western blot juostų intensyvumas normalizuotas pagal atitinkamą bendrą baltymų kiekį tuose pačiuose takeliuose. Skirtumų statistinis reikšmingumas apskaičiuotas naudojant suporuotą dvipusį Stjudento t -testą, lyginant Adh. su Susp. ir Adh. su Agr., jis yra reikšmingas ($N = 4$, $p < 0,05$, pažymėta žvaigždutėmis). (d) FAK slopiklis PF573228 didina JNK fosforilinimą prilipusiose ląstelėse. Po 24 val. inkubacijos ląstelės buvo lizuotos. Western blot nuotraukos gautos naudojant antikūnus prieš aktyvuotas JNK1/2 formas (pT183/pY185). Pateiktos reprezentatyvios Western blot nuotraukos; Coomassie mėlyna spalva nudažyti SDS-PAGE geliai parodyti kaip kiekio kontrolė. Adh. – prilipusios ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės suspensijoje, Agr. – ląstelės agregatuose. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)



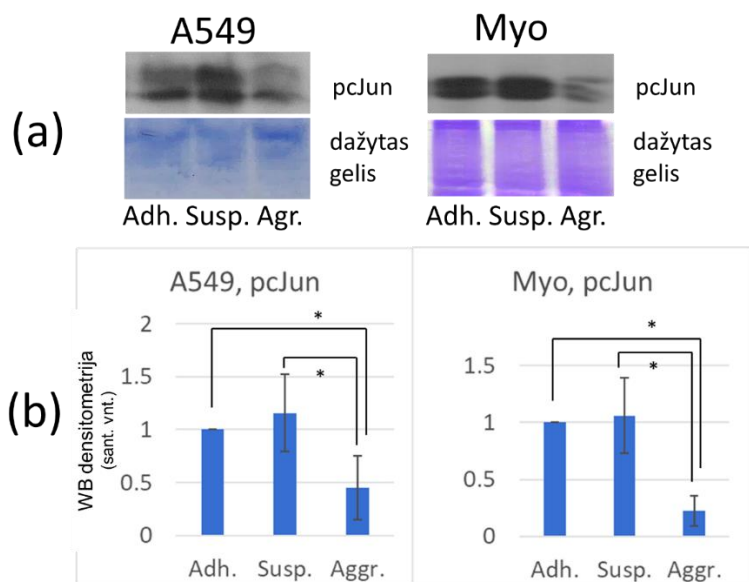
R10 pav. Tirtuose ląstelių modeliuose AKT, ERK2, p38 ir JNK bendro (totalinio) baltymo kiekis nekinta nei netekus kontakto su substratu, nei paveikus FAK slopikliu PF573228. Ląstelės lizuotos praėjus 24 val. nuo eksperimentų pradžios. Pateiktos reprezentatyvios Western blot nuotraukos; Coomassie mėlyna spalva nudažyti SDS-PAGE geliai parodyti kaip kiekio kontrolė. Adh. – prilipusios ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės suspensijoje, Agr. – ląstelės agregatuose. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)



R11 pav. JNK slopiklio įtaka ląstelių proliferacijai ant 2D paviršiaus. Tiek vėžinių A549, tiek kamieninių Myo ląstelių dauginimuisi yra reikalingas JNK aktyvumas. Gyvybingumas matuotas MTT metodu. DMSO – tirpiklio kontrolė, SP600125 – JNK slopiklis (20 μM). N=3, skirtumai patikimi.

Norėdami sužinoti užląstelinių kontaktų įtaką JNK pagrindiniam taikiniui transkripcijos veiksmui cJun, tyrėme jo fosforilinimo pokyčius atlipimo sąlygose. Kaip parodyta R12 pav., santykinai didžiausias

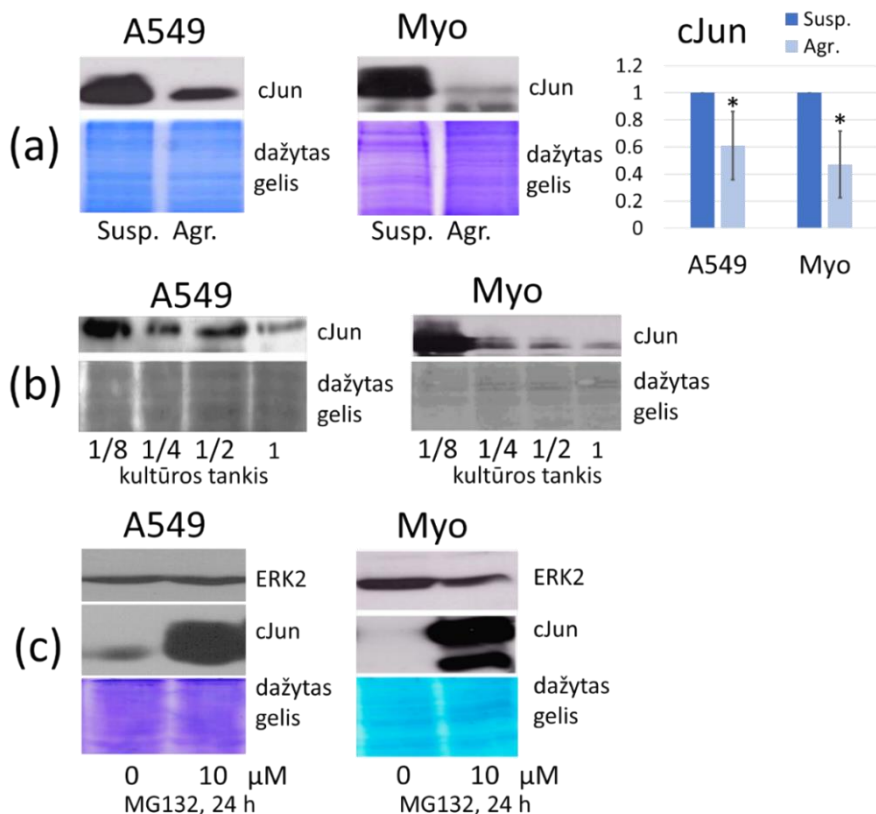
fosforilinimo lygis yra pavienėse suspensinėse ląstelėse, mažiausias – agregatuose, ir tarpinis – prilipusiose.



R12 pav. *cJun* fosforilinimas priklauso nuo užląstelių kontaktų. (a) *cJun* fosforilinimas pozicijoje S63 yra mažesnis agregatuose esančiose ląstelėse nei pavienėse ląstelėse suspensijoje arba ląstelėse, prilipusiose prie substrato, tiek A549, tiek Myo ląstelėse. Parodyti reprezentatyvūs Western blot vaizdai; Coomassie mėlyna spalva nudažyti SDS-PAGE geliai naudoti kaip kiekio kontrolė. Ląstelės buvo lizuotos po 24 val. inkibacijos. (b) Fosfo-*cJun* baltymo kiekybinis palyginimas, siekiant įvertinti skirtumus tarp prilipusių ir agregavusių ląstelių bei ląstelių suspensijoje ir agregavusių ląstelių. Keturių nepriklausomų eksperimentų, atliktų tomis pačiomis sąlygomis, Western blot juostų intensyvumas normalizuotas pagal atitinkamą bendrą baltymų kiekį tuose pačiuose takeliuose. Skirtumų statistinis reikšmingumas apskaičiuotas naudojant suporuotą dvipusį Stjudento *t*-testą, lyginant Adh. su Agr. ir Susp. su Agr., jie yra reikšmingi ($N = 4$, $p < 0,05$, pažymėta žvaigždutėmis). Adh. – prilipusios ląstelės, Susp. – pavienės ląstelės suspensijoje, Agr. – agregavusios ląstelės. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Tai rodo, kad tarpląsteliniai kontaktai (ląstelių agregatuose) mažina cJun fosforilinimą tiek Myo, tiek A549 ląstelėse, ir kaip parodė vėlesni tyrimai – taip pat ir raišką (pav. R13a). Dar daugiau, cJun raiška, pasirodo, priklauso nuo ląstelių kultūros tankio ant paviršiaus. Kaip parodyta pav. R13b, ir vėžinėse, ir kamieninėse ląstelėse cJun raiška didelė, kai kultūra labai reta, ir kultūrai tankėjant cJun raiška akivaizdžiai mažėja. Tai patvirtina ankstesnius pastebėjimus, kad kontaktai ląstelė-ląstelė (tankioje kultūroje ir agregatuose) slopina cJun raišką.

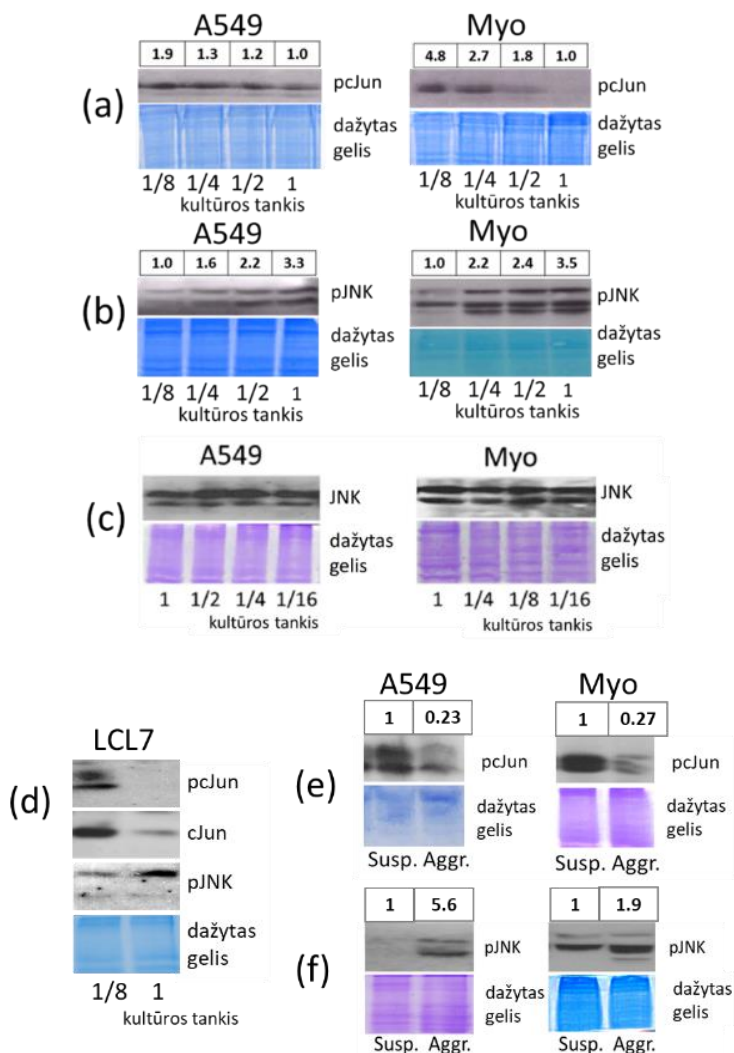
Panaudodami proteasomų slopiklį MG132 nustatėme, kad jis ženkliai padidino cJun baltymo kiekį tankiose ląstelių kultūrose. (pav. R13c), todėl manytina, kad tarpląsteliniai kontaktai reguliuoja cJun kiekį baltymo lygyje, galimai skatinant cJun proteasominę degradaciją. Kito tirtą baltymo – ERK2 – kiekis nebuvo priklausomas nei nuo ląstelių kultūros tankio, nei nuo proteasomų slopiklio MG132.



R13 pav. Nuo tarpląstelių kontaktų priklausomas cJun baltymo raiškos reguliavimas. (a) Tarpląsteliniai kontaktai slopina cJun baltymo raišką A549 ir Myo ląstelių agregatuose. Agreguotos ląstelės (Agr.) turi mažiau cJun baltymo nei pavienės ląstelės suspensijoje (Susp.). Dešinėje: Densitometrinis cJun baltymo kiekybinis palyginimas, siekiant įvertinti skirtumus tarp ląstelių suspensijoje ir ląstelių agregatuose. Keturių nepriklausomų eksperimentų Western blot juostų intensyvumas normalizuotas pagal atitinkamą bendrą baltymo kiekį tuose pačiuose takeliuose. Skirtumo statistinis reikšmingumas apskaičiuotas naudojant suporuotą dvipusį Stjudento t-testą, lyginant Agr. ir Susp. ląsteles, jis yra reikšmingas ($p = 0,025$ A549 ir $p = 0,003$ Myo ląstelėms). (b) cJun kiekis ląstelėse mažėja didėjant ląstelių tankiui. (c) Proteasomų slopiklis MG132 tankiai auginamose ląstelių kultūrose reikšmingai padidina cJun baltymų kiekį, bet ne ERK2. Pateiktos reprezentatyvios Western blot nuotraukos. Nudažyti SDS-PAGE geliai naudojami kaip kiekio kontrolė. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034)

Priešingas cJun ir JNK fosforilinimo priklausomumas nuo ląstelė-ląstelė kontaktų

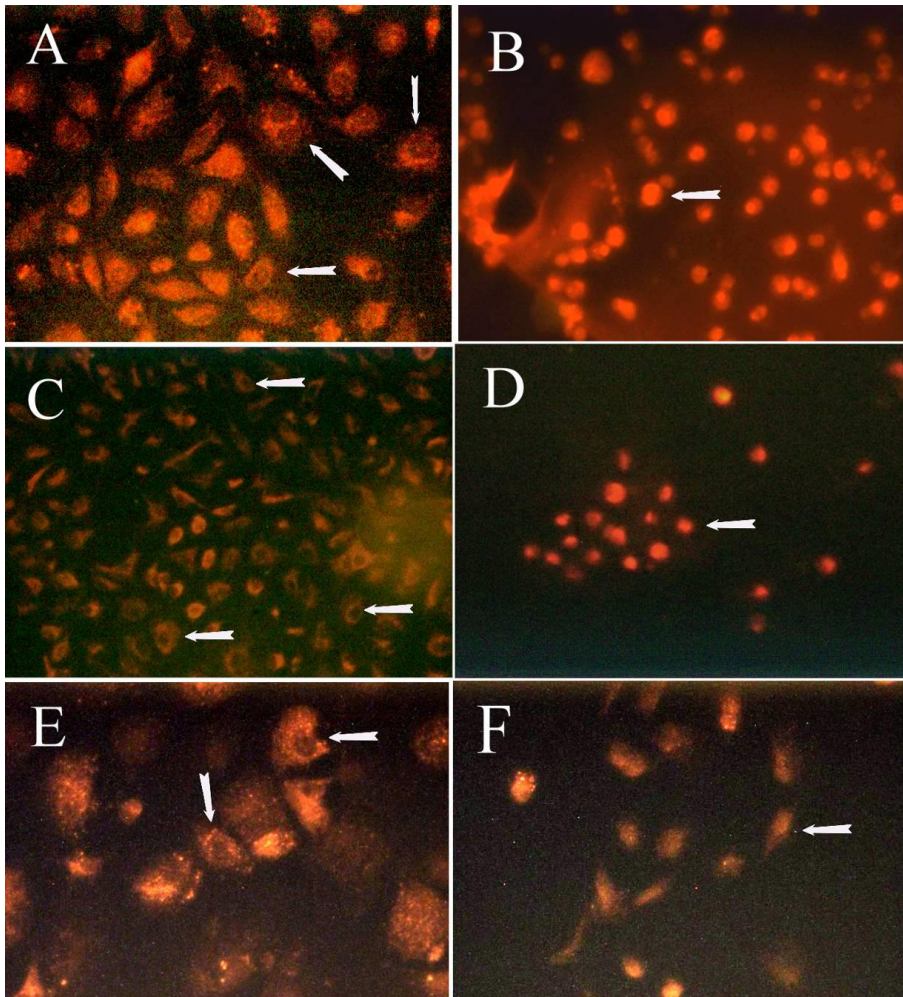
Norėdami išsiaiškinti užląstelinių kontaktų poveikį signalo perdavimui JNK kelyje, WB metodu ištyrėme JNK bei cJun aktyvinančio fosforilinimo kitimą, priklausomai nuo ląstelių tankio prilipusių ląstelių kultūrose. R14 pav. pateikti duomenys rodo, kad tankesnėje kultūroje cJun fosforilinimas mažesnis, tačiau JNK fosforilinimas didesnis, lyginant su reta kultūra. Tuo metu bendras JNK baltymo kiekis nekito. Tokiu būdu nustatėme, kad ląstelių kultūros tankis priešingai veikia cJun ir JNK fosforilinimą, t. y., nors JNK aktyvumas tankėjant kultūrai ir ląstelėms vis labiau kontaktuojant didėja, tačiau cJun fosforilinimas mažėja, galimai dėl to, kad sumažėja ir bendras cJun baltymo kiekis. Taip pat, analogiškai, ląstelių agregatuose cJun fosforilinimas slopinamas, tuo metu kai JNK yra daugiau fosforilinta agregatuose negu pavienėse ląstelėse suspensijoje.



R14 pav. Priešingas *cJun* ir *JNK* fosforilinimo reguliavimas užląsteliniais kontaktais. (a) *cJun* fosforilinimas mažėja didėjant ląstelių tankiui kultūroje. (b) *JNK* fosforilinimas didėja didėjant ląstelių tankiui kultūroje. (c) Bendras *JNK* baltymo kiekis yra vienodas, esant skirtingam ląstelių kultūros tankiui. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034). (d) LCL pirminėse linijose stebimas toks pat reiškinys. (e) *cJun* fosforilinimas ląstelių agregatuose mažesnis nei pavienėse ląstelėse suspensijoje. (f) *JNK* fosforilinimas ląstelių agregatuose didesnis nei pavienėse ląstelėse suspensijoje. Pateiktos reprezentatyvios Western blot nuotraukos. Skaičiai virš blotų rodo santykinį juostelių intensyvumą (žr. Metoduose densitometrijos aprašymą). Nudažyti SDS-PAGE geliai naudojami kaip kiekio kontrolė.

Apibendrinant aukščiau pateiktus tyrimus galima teigti, kad nepriklausomai nuo ląstelių tipo, tirtų proteinkinazių bazinis fosforilinimas, nors ir skirtingai, priklauso nuo ląstelės prisitvirtinimo, t.y. jis pakinta keičiantis ląstelių sąveikoms su substratu ar tarpusavyje. (Baziniu fosforiliniu čia vadiname ilgai trunkantį, nuolatinį fosforilinimo lygį ląstelėse, kurios papildomai neveikiamos jokiais išoriniais nenatūraliais veiksniais). Streso kinazių JNK ir p38 bazinis fosforilinimas kinta kitaip, nei AKT fosforilinimas Myo ir A549 ląstelėse, joms atkimbant nuo paviršiaus: netekus kontaktų su substratu AKT fosforilinimas sumažėja, tuo metu kai JNK ir p38 padidėja. Netikėtai, ERK1/2 fosforilinimo padidėjimas pastovios plaučių vėžio A549 linijos ląstelėse, priešingai nei sumažėjimas kitose tirtose plaučių vėžio kilmės ląstelių linijose, nustatytas netekus kontaktų ląstelė-substratas. Abi, tiek ERK, tiek AKT, yra išgyvenimo kinazės *anoikis* sąlygose plaučių vėžio A549 ir raumeninės kilmės kamieninėse Myo9 ląstelėse, o tarpląsteliniai kontaktai ląstelių agregatuose didina šių kinazių fosforilinimą bei ląstelių išgyvenimą. Prilipusių ląstelių 2D kultūroje kontaktai tarp ląstelių ženkliai sumažino JNK taikinio transkripcijos veiksnio cJun kiekį (galimai dėl degradavimo proteasomose) ir fosforilinimą. Be to, tyrimai atskleidė priešingą ląstelių kultūros tankio įtaką to paties signalinio kelio molekulių – fosfo-cJun ir fosfo-JNK – baziniam lygiui. Tai rodo, kad cJun N-galo kinazės aktyvacijos rezultatas ląstelėse gali priklausyti nuo esamo cJun kiekio, kurį nulemia tarpląsteliniai kontaktai.

Papildomai esame atlikę JNK signalinio kelio molekulių lokalizacijos tyrimus. Imunocitochemijos ir Western blot metodais stebėjome, kaip keičiasi JNK ir cJun baltymo bei jų fosforilintų formų lokalizacija, atkreipiant dėmesį į citoplazminį ir branduolinį pobūdį. Gavome duomenų, kad šių signalinių molekulių judėjimas tarp citoplazmos ir branduolio galimai lemia JNK vaidmenį žūties reguliacijoje. Štai leukeminėse K562 ir proliferuojančiose kamieninėse Myo ląstelėse, kuriose JNK paskatina apoptozę, JNK molekulės po cisplatinos poveikio yra lokalizuotos branduoliuose, tuo metu A549 bei diferencijuotose miogenine kryptimi Myo ląstelėse (jose JNK slopina apoptozės indukciją paveikus cisplatiną) – citoplazmoje (R15 pav.). Pateikti Western blot duomenys (R16 pav.) rodo, kad JNK signalinio kelio molekulės (fosforilinta JNK bei fosfo cJun) kraujo vėžio K562 ląstelėse labiau nei plaučių vėžio A549 ląstelėse, paveikus cisplatiną, kaupiasi branduoliuose. Fosfo-cJun kiekio kitimas, parodytas Western blot metodu, abiejose ląstelių linijose patvirtino jo, kaip indukuojamo transkripcijos veiksnio branduolyje, vaidmenį. Taigi, mūsų tyrimai panaudojus ląstelių žūties modelius, pasižymintį skirtingu JNK vaidmeniu apoptozėje, preliminariai parodė, kad JNK lokalizacija ląstelėje koreliuoja su jos vaidmeniu apoptozėje.



R15 pav. JNK viduląstelinė lokalizacija (antikūnai prieš bendrą JNK2). Fluorescenciniu mikroskopu nufotografuotuose vaizduose matoma skirtinga JNK baltymo lokalizacija (oranžinė spalva).

A – A549, cisplatina 60 μM ;

B – K562, cisplatina 60 μM ;

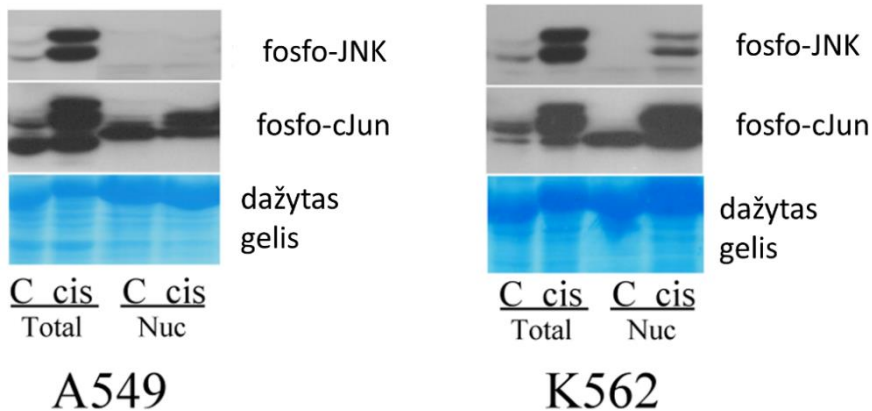
C – A549, cisplatina 90 μM ;

D – K562, cisplatina 90 μM ;

E – Myo diferencijuotos, cisplatina 60 μM ;

F – Myo proliferuojančios, cisplatina 60 μM .

Poveikių trukmė 8 val. Kairėje pusėje rodyklėmis parodytos ląstelės, kurių branduoliuose švytėjimas mažesnis nei citoplazmoje. Dešinėje matoma, kad kai kuriose ląstelėse branduoliai švyti stipriau už citoplazmą.



R16 pav. JNK signalinio kelio molekulių lokalizacija vėžinėse ląstelėse. A549 ląsteles paveikus cisplatina, fosforilinta JNK forma nekeliauja į branduolį, tuo tarpu K562 ląstelėse, po cisplatinos poveikio, branduoliuose atsiranda daugiau fosfo-JNK. C – kontrolinių ląstelių lizatai, cis – 6 val. terpėje su cisplatina (60 μ M) laikytų ląstelių lizatai; Total – viso ląstelių turinio lizatai, Nuc – branduolių frakcija.

3.2. MAPK ir AKT signalinių kelių molekulių, kaip galimų taikinių plaučių vėžio terapijoje, tyrimas

Antrame darbo etape tyrėme MAP kinazės ERK bei proteinkinazės AKT signalinių kelių tarpusavio sąveikos galimybę skirtingų plaučių vėžio linijų ląstelėse.

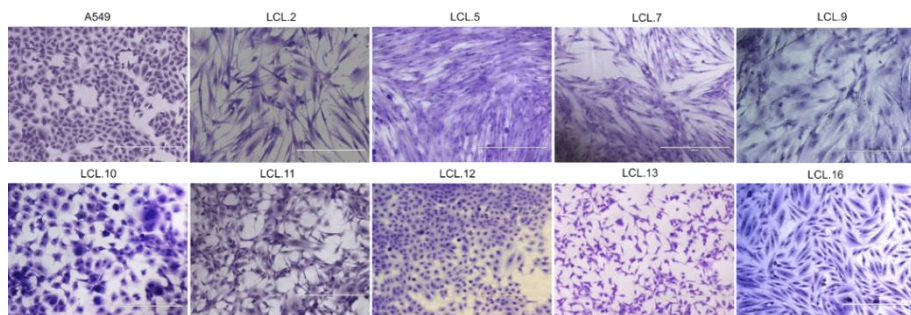
Charakterizavimas ląstelių linijų, gautų iš žmogaus plaučių vėžio mėginių

T1 paveiksle pateikiame tyrimo metu nustatytas šių ląstelių charakteristikas. Mikrofotografijose matomos skirtingo fenotipo (epitelinio ar mezenchiminio) ląstelės (T1 pav., A). Kamieniškumo, taip pat su epitelinio-mezenchiminio virsmo (EMT) susijusių transkripcijos reguliatorių, dalyvaujančių vėžio, įskaitant plaučių vėžį, vystymesi ir progresavime – NANOG, OCT4, SOX2, SOX9, MYC, HOXA5, FOXO1, FOXC2, SNAIL1, SNAIL2, ZEB1, ZEB2, TWIST1 ir TWIST2 – mRNR raiškos tyrimai atskleidžia, kad ląstelės yra skirtingos pagal šiuos žymenis (T1 pav., B). Baltymų, priklausančių tarpinių filamentų šeimai – vimentino ir citokeratino – koekspresija, nustatyta Western blot metodu (T1 pav., C), rodo, kad ląstelės turi dalinio EMT požymių. Buvo įvertintas ir bazinis ERK ir AKT kinazių fosforilavimo lygis šiose ląstelių linijose. PI3K/AKT ir MAPK signalinių kelių molekulės, reguliuojančios ląstelių dauginimąsi ir išgyvenimą, AKT ir ERK,

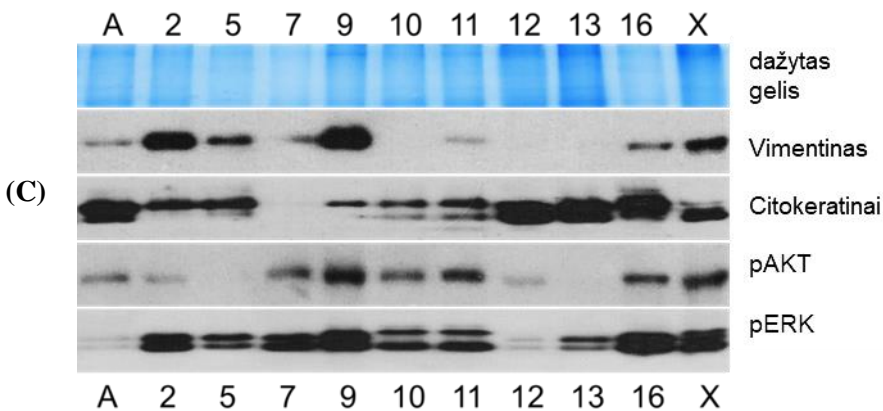
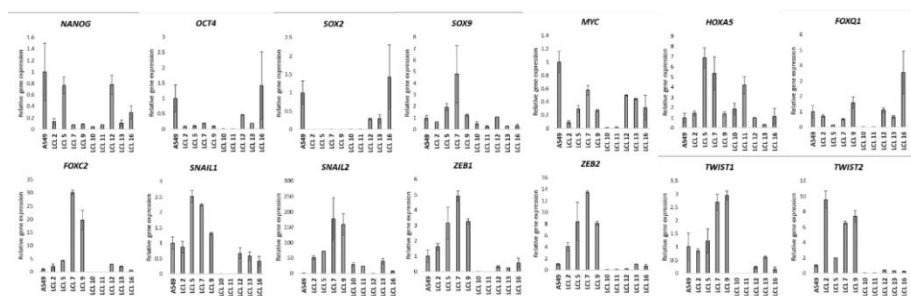
dažnai yra aktyvuotos vėžio ląstelėse. Duomenys, pateikti T1 pav. C apačioje rodo fosforilintas ERK ir AKT kinazes ląstelių linijose, nors ir skirtingu laipsniu. Kai kurie pokyčiai tirtose ląstelėse buvo pastebėti ir jas auginant *in vitro*, kas yra žinoma mokslinėje literatūroje kaip vėžinių ląstelių plastiškumas. T2 paveiksle pateiktose nuotraukose (imunofluorescencinis metodas) matome įvairių žymenų (vimentino, CD44, E-kadherino, beta-katenino) raišką ir lokalizaciją.

Šios ląstelių linijos buvo naudojamos tolesniuose mūsų tyrimuose.

(A)

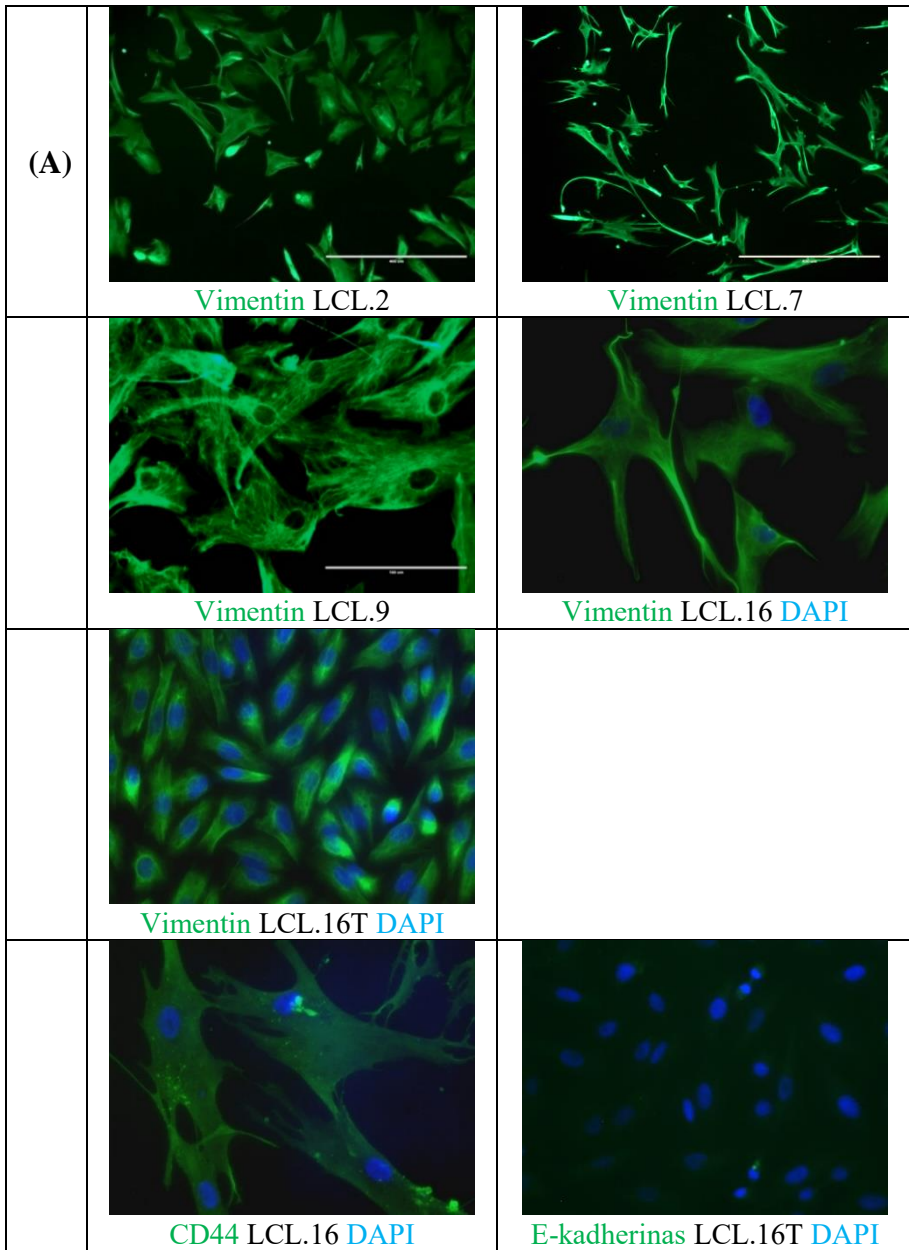


(B)



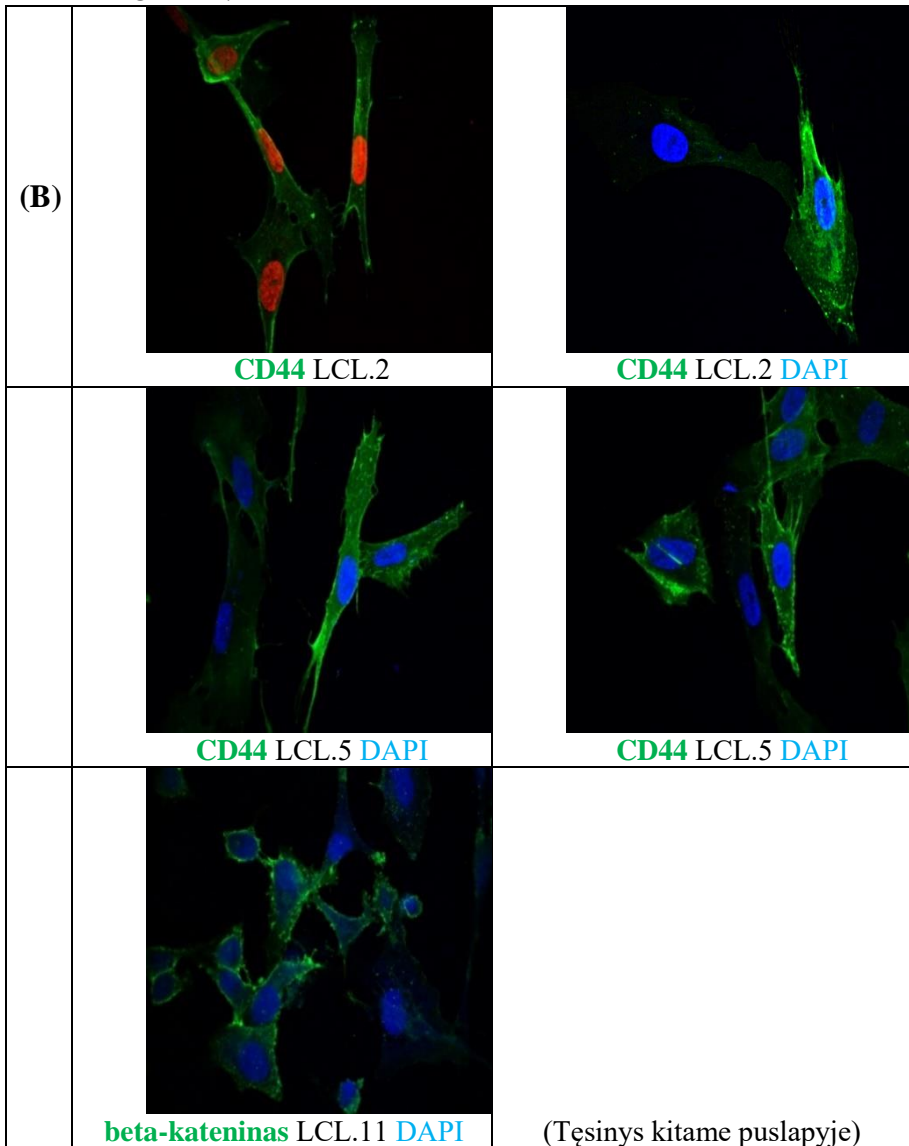
T1 pav. Žmogaus plaučių NSCLC navikinės kilmės ląstelių linijų apibūdinimas. (A) A549 ląstelių ir pirminių ląstelių linijų, auginamų *in vitro*

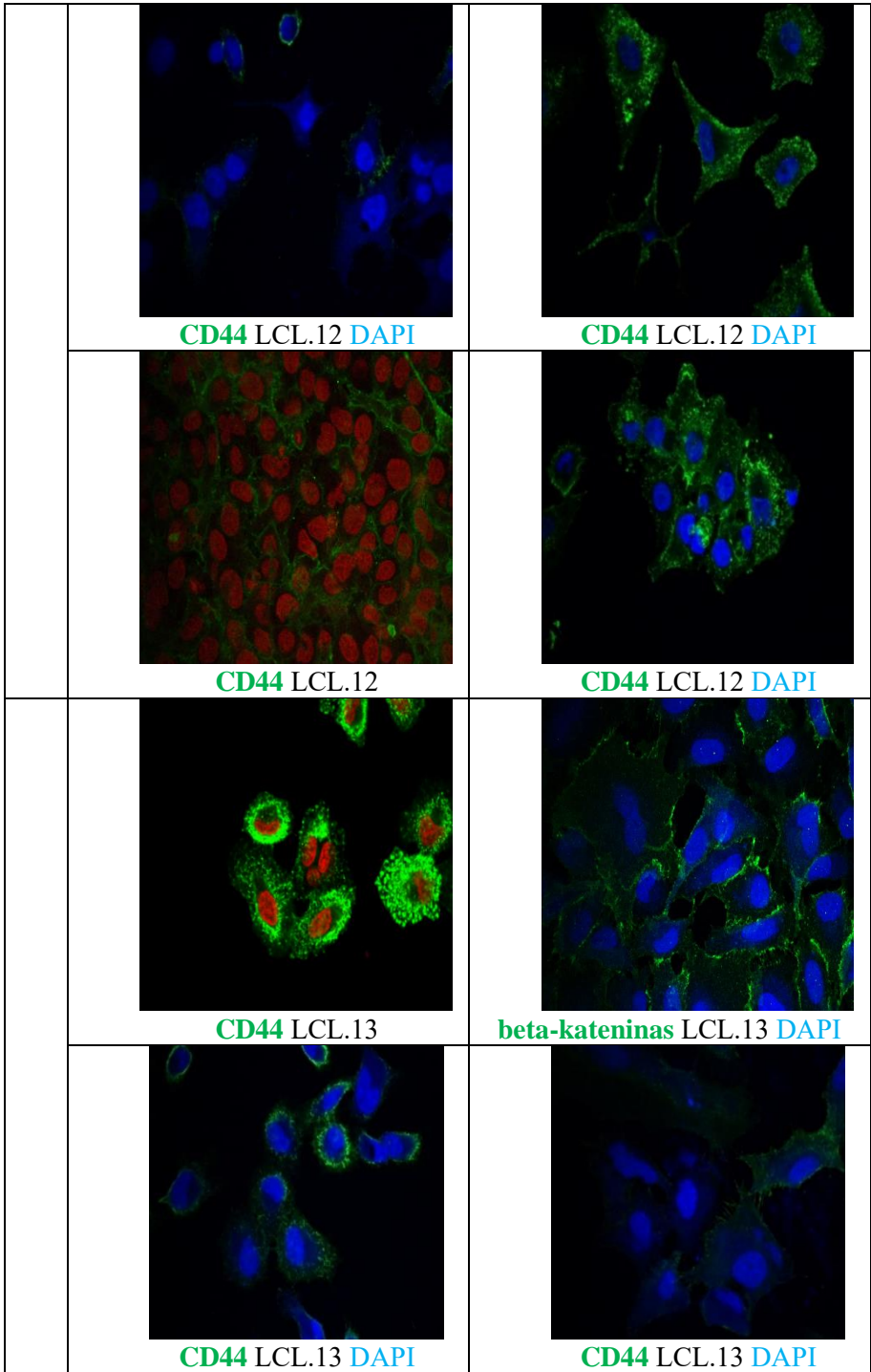
daugiau kaip 10 persėjimų, morfologija. Mastelio juosta – 400 μm . Ląstelės nudažytos kristalinio violeto dažais. (B) Santykinė kamieninių ląstelių ir su EMT susijusių transkripcijos veiksnių raiška, nustatyta RT-qPCR metodu (lyginant su GAPDH). Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm SD (N = 2). Pastaba: didesnis nuotraukų ir diagramų formatas pateiktas šios disertacijos prieduose, psl. 134-136. (C) Skirtinga mezenchiminių ir epitelinių žymenų citokeratino ir vimentino (tarpinių filamentų šeimos baltymai) bei aktyvuotų baltymų kinazių fosfo-ERK ir fosfo-AKT raiška plaučių vėžio kilmės ląstelių linijose, nustatyta Western blot metodu. Pateiktos daugiau nei 3 nepriklausomų eksperimentų reprezentatyvios nuotraukos. Coomassie dažyti poliakrilamidiniai geliai panaudoti kaip kiekio kontrolė. Skaičiais pažymėtos ląstelių linijos; A – A549; X – teigiama kontrolė. (Copyright © 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkevičienė, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelytė. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).



T2 pav. Ląstelių imunofluorescencinės nuotraukos. (A, viršuje) Pirminis antikūnas prieš tarpinį filamentą vimentiną, taip pat vėžinių ląstelių kamieniškumo ženklą CD44, ir epitelinio fenotipo ženklą E-kadheriną. Skirtingi masteliai: LCL.2 ir LCL.7 atvejais – brūkšnelio ilgis 400 μm ; LCL.9 ir LCL.16 atvejais – 100 μm . (B, žemiau) Konfokalinės nuotraukos, pirminiai antikūnai prieš CD44 ir su EMT susijusio Wnt signalinio kelio molekule beta-

kateniną. Branduoliai nuspalvinti mėlyna arba raudona spalva. Paveikslėlio kraštinės ilgis 132 μm.

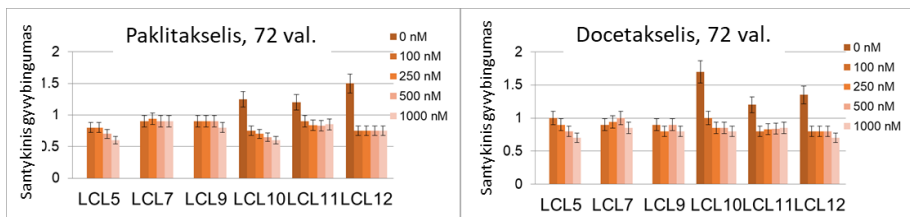




Šiame tyrime buvo naudojami MAPK ERK1/2 ir AKT kinazės veikiantys vaistai, esantys įvairiose klinikinių tyrimų stadijose, bei jų deriniai su įprastiniais priešvėžiniais vaistais, darant poveikius šioms plaučių vėžio ląstelių linijomis.

Prieš tirdami vaistų veikimo mechanizmus skirtingos kilmės ląstelėse, pirmiausia įvertinome įvairių chemoterapinių preparatų, tokių kaip cisplatina, paklitakselis ir docetakselis, naudojamų klinikiniam plaučių vėžio gydymui, veiksmingumą mūsų ląstelėms.

Įvairių plaučių vėžio pirminių ląstelių linijų atsparumo taksanams tyrimas parodė, kad paveikus tiek paklitakseliu, tiek docetakseliu koncentracijų ribose nuo 100 nM iki 1000 nM nebuvo didelio skirtumo, t.y. ląstelės 3 paras išlaikė gan stabilų gyvybingumą (T3 pav.).



T3 pav. Taksanų poveikis skirtingoms iš plaučių naviko gautoms ląstelių linijoms. Ląstelių gyvybingumas matuotas MTT metodu praėjus 72 valandoms nuo poveikio pradžios. Y ašis – Ląstelių gyvybingumas santykiniais vienetais (MTT absorbcijos vertės po poveikio santykis su MTT absorbcijos verte prieš poveikį). Duomenys išreikšti vidurkiais \pm SD, N = 4.

Tolimesniam tyrimui buvo pasirinktas vaistas cisplatina, šiuo metu naudojamas plaučių vėžiui gydyti, taip pat ERK ir AKT signalų perdavimo kelių signalo perdavimo slopikliai: MEK slopikliai selumetinibas ir trametinibas, ERK slopiklis SCH772984, AKT slopiklis kapivasertibas, AKT inhibitorius VIII, PI3K slopiklis idelalisibas. *In vitro* gyvybingumo/citotoksiškumo eksperimentai atlikti naudojant MTT arba resazurino redukcijos metodus.

Cisplatinos ir taikinių vaistų, nukreiptų į ERK1/2 ir AKT signalinių kelių molekules, poveikis ląstelių gyvybingumui bei ERK1/2 ir AKT fosforilinimui

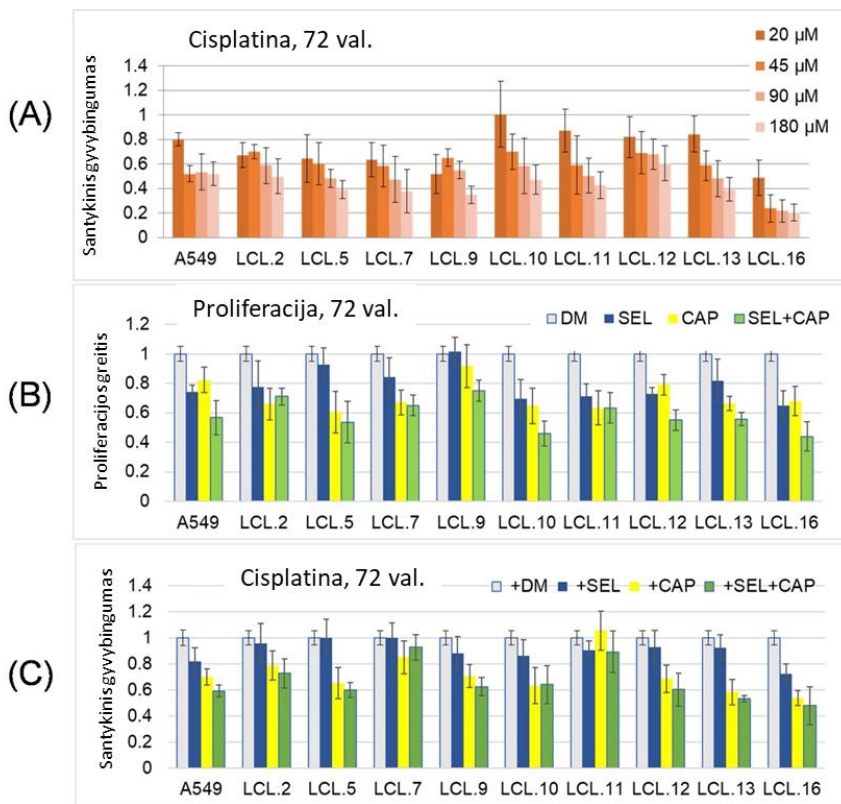
Atliekant bandymus *in vitro*, eilėje dozės-atsako eksperimentų (T4 pav.) buvo parodytas nevienodas ląstelių linijų jautrumas vaistams. Matomi skirtumai, reaguojant į įprastą chemoterapinį vaistą cisplatiną ir taikinius

vaistus, nukreiptas ERK ir AKT signalizacijos kelių molekules. Gyvybingumo testai parodė nevienodą nuo cisplatinos koncentracijos priklausomą ląstelių gyvybingumo sumažėjimą skirtingose plaučių vėžio ląstelių linijose (po 72 valandų trukmės poveikio).

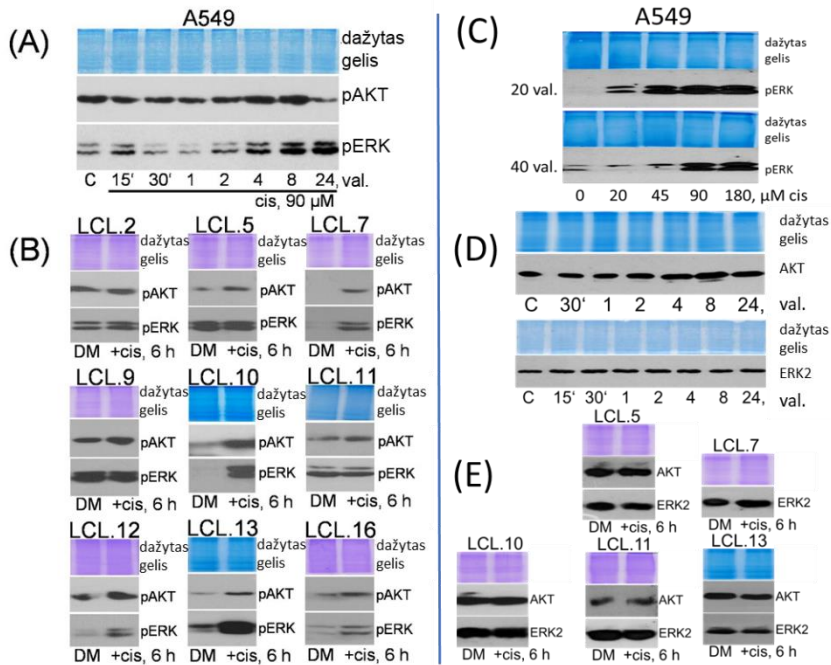
Tuo tarpu į viduląstelinę kinazę ERK1/2 bei į AKT nukreipti vaistai slopino ląstelių dauginimąsi, tačiau neturėjo ženklaus poveikio cisplatinos sukeltai ląstelių žūčiai, kai jie buvo naudojami atskirai, nors tarp ląstelių linijų šiuo požiūriu buvo matomi skirtumai. Pastebėtina, kad kombinuotas ERK ir AKT slopinimas sukėlė ženklesnes anti- proliferacines ir žuvimą nuo cisplatinos sustiprinančias reakcijas, nors ir vėl – skirtingo laipsnio skirtingose linijose. Apibendrintai galima sakyti, jog yra tendencija, kad kombinuoto ERK (selumetinibas) ir AKT (kapivasertibas) kelių slopinimo įtaka proliferacijai ar cisplatinos sukeliama žūčiai yra didesnė nei pavienio kelio slopinimas.

Nors apskritai ląstelių linijos buvo gana atsparios tirtiems vaistams (atkreipkite dėmesį, kad kinazių inhibitoriai nesukėlė ląstelių žūties, nors stabdė proliferaciją; panašiai, didžiausia cisplatinos koncentracija nesunaikino daugiau nei 60 proc. ląstelių per 3 paras), ląstelinis atsakas rodo, kad tiek ERK, tiek AKT dalyvauja reguliuojant ląstelių išgyvenimą po tokio gydymo.

Siekiant tai patvirtinti, buvo tiriami šių baltymų kinazių fosforilinimo pokyčiai po cisplatinos poveikio. WB analizė parodė abiejų kinazių fosforilinimo pokyčius (T5 pav.). A549 ląstelėse cisplatina lėmė palaipsnių ir ilgalaikį ERK fosforilinimo padidėjimą, mažesni buvo stebimi AKT kinazės fosforilinimo pokyčiai. ERK ir AKT fosforilinimo padidėjimas taip pat buvo nustatytas kitose ląstelių, paveiktų cisplatiną, linijose: paveiksle T5, B pateikti duomenys apie ERK ir AKT fosforilinimo padidėjimą po 6 valandų poveikio cisplatiną. Baltymų raiška eksperimento sąlygomis lieka nepakitusi.



T4 pav. Cisplatinos ir taikinių vaistų poveikis skirtingoms plaučių vėžio ląstelių linijoms. Iš plaučių vėžio gautos ląstelės skirtingai reaguoja į vaistus nuo vėžio. (A) Ląstelių gyvybingumo sumažėjimas ląstelių linijų grupėje, paveikus skirtingomis cisplatinos koncentracijomis 72 valandas. Y ašis – ląstelių gyvybingumas išreikštas santykiniais vienetais atžvilgiu pradinės kontrolės (MTT absorbcijos vertės po poveikio santykis su MTT absorbcijos verte prieš poveikį). Duomenys išreiškiami vidurkiais \pm SD, N = 4. (B) Taikiniai vaistai slopina ląstelių dauginimąsi. Proliferacija be slopiklių prilyginama 1,0. (C) Plaučių vėžio ląstelės skirtingai reaguoja į taikinių vaistų ir cisplatinos derinius. Ląstelių išgyvenamumas be inhibitorių prilyginamas 1,0. Šiuose bandymuose buvo naudojamos cisplatinos koncentracijos, kurios po 72 valandų poveikio sukelia 50% ląstelių žūtį, ir skirtingoms ląstelėms jos buvo skirtingos. DM – tirpiklis DMSO, SEL – ERK slopiklis selumetinibas, CAP – AKT slopiklis kapivasertibas. (© 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).

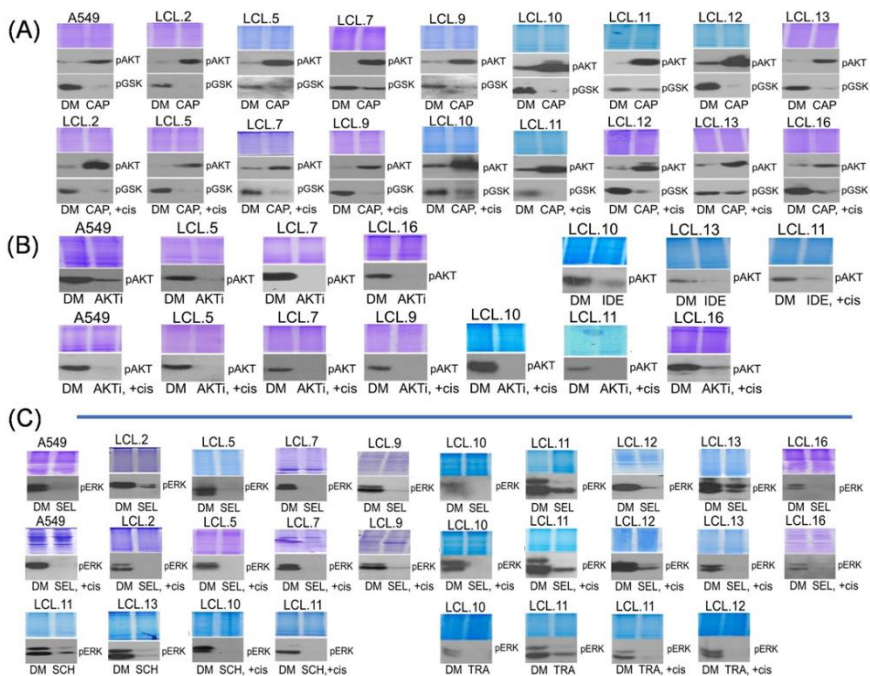


T5 pav. ERK ir AKT fosforilinimas plaučių vėžio kilmės ląstelių linijose jas paveikus cisplatina. (A) pAKT lygis A549 ląstelėse laikui bėgant kinta nežymiai, tuo tarpu pERK lygis reikšmingai padidėja. (B) Iš plaučių vėžio gautose ląstelių linijose stebimas fosforilintų ERK ir/arba AKT baltymų padidėjimas (šešta valanda nuo poveikio cisplatina pradžios). (C) ERK fosforilinimas padidėjęs paveikus įvairiomis cisplatinos koncentracijomis (20 ir 40 val. nuo poveikio pradžios); 0 – be poveikio; (D) Bendras AKT ir ERK2 baltymo kiekis nekinta A549 ląstelėse, paveikus cisplatina. (E) Plaučių vėžio kilmės linijų ląstelėse AKT ir ERK2 kiekiai nekinta, paveikus cisplatina. DM – tirpiklio kontrolė (DMSO), +cis – cisplatina. Parodyti reprezentatyvūs Western blot paveiksai. Coomassie dažyti baltymų geliai pateikiami kaip kiekio kontrolė. Cisplatinos koncentracija buvo 90 μM , jei nenurodyta kitaip. (© 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).

Tolimesnis mūsų darbo tikslas buvo su signalo perdavimu susijęs atsparumo priešvėžiniam gydymui tyrimas, t.y. atsako į MEK/ERK ir PI3K/AKT kelių inhibitorius mechanizmai. Kaip vienas iš galimų atsparumo taikiniams vaistams mechanizmų buvo tiriamas alternatyvių kinazių aktyvinimas. Sąveikos tarp PI3K/AKT ir MEK/ERK kelių buvo ieškoma

naudojant šių signalizacijos kelių molekulių slopiklius atskirai arba kartu su cisplatina plaučių vėžio kilmės pirminėse ląstelių linijose.

Pirmiausia patvirtinome, kad taikiniai vaistai, nukreipti prieš MAP kinazę ERK, jos kinazę MEK, kinazę AKT bei jos aukštesnį aktyvatorių kinazę PI3K, neabejotinai turi biocheminį poveikį savo taikiniams mūsų tiriamoms ląstelėse (T6 pav.). Paradoksaliai, AKT slopiklis kapivasertibas **didino** AKT fosforilinimą Thr308 pozicijoje kontrolinėse ar cisplatina paveiktose ląstelėse. Siekiant įsitikinti, kad kinazės aktyvumas tikrai blokuotas, papildomai buvo parodytas tiesioginio AKT taikinio/substrato, kinazės GSK3-beta, fosforilinimo sumažėjimas visose tirtose ląstelių linijose, paveikus cisplatina ar be cisplatinos. AKT slopiklis VIII sumažino AKT fosforilinimą visose tirtose plaučių vėžio ląstelių linijose, o MEK slopiklis selumetinibas visais atvejais sumažino MEK taikinių ERK1/2 fosforilinimą. Patvirtinome ir kitų slopiklių (idelalisibo, SCH772984 bei trametinibo) poveikius savo taikiniams.



T6 pav. *Taikininių vaistų veiksmingumo nustatymas, remiantis jų taikinių fosforilinimo slopinimu. (A) AKT sloplikis kapivasertibas padidina paties AKT fosforilinimą. Kapivasertibo veiksmingumą rodo slopinamas GSK3β, AKT taikinio, fosforilinimo sumažėjimas. DM – kontrolinis tirpiklis (DMSO), CAP – kapivasertibas, +cis – cisplatina. (B) AKT VIII inhibitorius (AKTi) ir PI3K inhibitorius idelalisibas (IDE) sumažina AKT fosforilinimą kontrolinėse ir cisplatina paveiktose ląstelėse. (C) MEK/ERK signalų inhibitoriai slopina ERK1/2 fosforilinimą kontrolinėse ir cisplatina paveiktose ląstelėse. Pastaba: didesnis paveiklo formatas pateiktas prieduose, psl. 137. SEL – selumetinibas, SCH – ERK inhibitorius SCH772984, TRA – trametinibas. Pateiktos reprezentatyvios Western blot nuotraukos. Kaip kiekio kontrolė pateikti Coomassie mėliu nudažyti baltymų geliai. Naudotas 6 val. trukmės vaistų poveikis. Cisplatinos koncentracija buvo 90 μM, o inhibitorių – 10 μM, išskyrus trametinibą ir SCH772984 (1 μM). © 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkevičienė, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).*

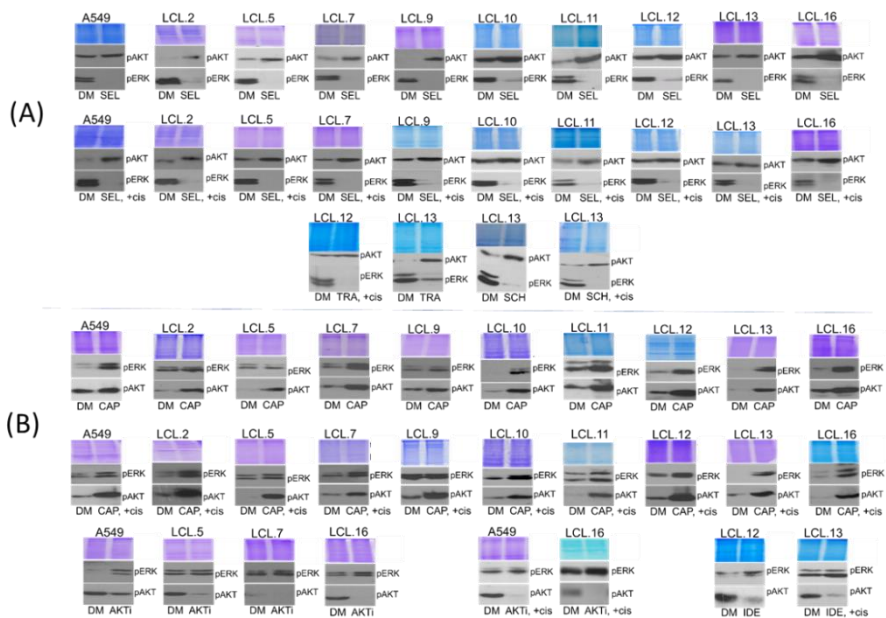
Neigiamas abipusis grįžtamasis ryšys tarp MEK/ERK ir PI3K/AKT signalinių kelių iš plaučių vėžio gautose ląstelių linijose

Neabejotina, kad genetinių profilių nustatymas navikuose gali žymiai pagerinti vėžio suvaldymą, tačiau dabar jau žinoma, kad daugelis vėžio savybių priklauso ne tik nuo mutacijų; taip pat, negenetinis ląstelių būklės moduliavimas gali stipriai keisti atsaką į gydymą (Hahn, Bader, Braun, Califano, Clemons, Yoda, et al. 2021). Egzistuoja įvairūs ląstelių atsparumo vaistams mechanizmai, kurie, beje, gali labai priklausyti nuo vėžinių ląstelių būsenos. O ląstelių likimą gali lemti dinaminė ERK ir AKT sąveika, kuriai įtakos turi ląstelei būdingi vidiniai ir išoriniai veiksniai.

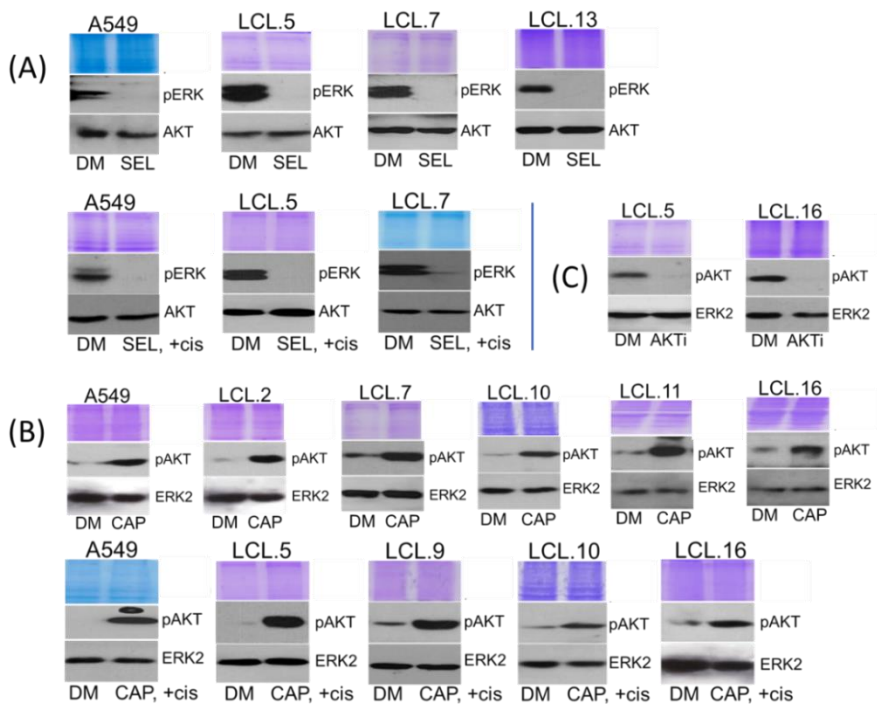
Yra žinoma, kad vienas iš galimų atsparumo taikiniams vaistams, kurie slopina kinazes, mechanizmas yra alternatyvių kinazių aktyvinimas ląstelėse. Signalizacijos kelių sąveika parodyta tam tikruose vėžio ląstelių modeliuose. PI3K/AKT ir MEK/ERK kelių kryžminės sąveikos reiškinys mūsų tyrimuose buvo analizuojamas naudojant šių signalinių kelių molekulių inhibitorius, atskirai arba kartu su cisplatina, plaučių vėžio kilmės pirminių linijų ląstelėse.

Yra duomenų/ nuomonė, kad grįžtamasis ryšys tarp AKT ir ERK kelių yra specifinis ląstelių linijai ir gali priklausyti nuo specifinių onkogeninių mutacijų vėžio ląstelėse. Buvo pasiūlyta, kad grįžtamą ryšį sustiprina aktyvinanti *KRAS* mutacija arba padidinta *cMET* raiška, taip nulemiant nejautrumą vaistams (Yuen et al. 2012). Turėdami tai omenyje, kad *KRAS* būseną lemia grįžtamąjį ryšį tarp PI3K/AKT ir MEK/ERK kelių, mes naudojome *KRAS* mutaciją turinčias A549 ląsteles (pastoviąją ląstelių liniją), kad palygintume alternatyvių kinazių aktyvavimo reiškinį su kitais ląstelių tipais.

Lygiagrečiai A549, tyrėme ląstelių linijas, gautas iš plaučių navikų, nors ir be genetinio profiliavimo, ir nustatėme, kad kryžminio slopinimo reiškinys buvo būdingas visiems mūsų tirtiems ląstelių tipams. Kaip parodyta T7 paveiksle, ląstelių poveikiai ERK slopikliais selumetinibu, trametinibu, SCH772984 padidino AKT fosforilinimą (T7 pav., A). Ir atvirkščiai, AKT signalo perdavimo slopinimas kapivasertibu, idelalisibu ir AKT inhibitoriumi VIII padidino ERK fosforilinimą visose tirtose ląstelių linijose, tiek kontrolinėse, tiek paveiktose cisplatina (T7 pav., B). Taigi, plaučių ląstelėse buvo patvirtintos kompensacinė grįžtamojo ryšio sąveika tarp dviejų signalo perdavimo kelių: ERK kelio slopinimas aktyvavo AKT kelią, ir atvirkščiai. Sąveika buvo realizuojama per baltymo fosforilinimą, nes bendras alternatyvios kinazės baltymo kiekis išliko nepakitęs (T8 pav.)

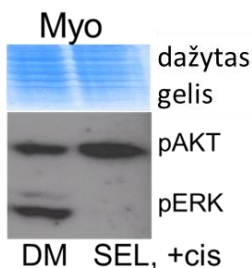


T7 pav. ERK ir AKT signalų kryžminė sąveika plaučių vėžio ląstelių linijose. Pastaba: didesnis paveikslas pateiktas prieduose, psl. 138-149. (A) ERK/MEK inhibitoriai selumetinibas, trametinibas, taip pat ERK slopiklis SCH772984 padidina AKT fosforilinimą visose ištirtose ląstelių linijose, kai nėra cisplatinos arba ją pridėjus. (B) AKT slopikliai kapivasertibas, AKT inhibitorius VIII, PI3K slopiklis idelalisibas sustiprina ERK1/2 fosforilinimą visose ištirtose ląstelių linijose, kontrolinėse arba cisplatiną paveiktose ląstelėse. Pateikti tipiniai Western blot paveikslai. Coomassie dažyti baltymų geliai pateikiami kaip kiekio kontrolė. Buvo naudojamas 6 valandas trunkantis vaistų poveikis. Cisplatinos koncentracija 90 μM . Kinazių slopiklių koncentracija buvo 10 μM , išskyrus trametinibą ir SCH772984 (1 μM). DM – tirpiklio kontrolė (DMSO), SEL – selumetinibas, +cis – cisplatiną, TRA – trametinibas, SCH – ERK inhibitorius SCH772984, CAP – kapivasertibas, AKTi – AKT inhibitorius VIII, IDE – idelalisibas. © 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkevičienė, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).



T8 pav. Taikiniai vaistai neturi įtakos alternatyvios kinazės baltymo raiškai. (A) ERK/MEK inhibitoriai selumetinibas nekeičia AKT baltymo kiekio visose ištirtose ląstelių linijose, kai nėra cisplatinos arba ją pridėjus. (B,C) AKT slopikliai kapivasertibas ir AKT inhibitorius VIII nekeičia ERK2 baltymo kiekio visose ištirtose ląstelių linijose, kontrolinėse arba cisplatina paveiktose ląstelėse. Pateikti tipiniai Western blot paveikslai. Coomassie dažyti baltymų geliai pateikiami kaip kiekio kontrolė. Buvo naudojamas 6 valandas trunkantis vaistų poveikis. Cisplatinos koncentracija buvo 90 μM . (© 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).

MEK slopiklis selumetinibas sukėlė AKT fosforilinimo padidėjimą diferencijuotose triušio raumens ląstelėse Myo, praėjus 16 val. nuo poveikio 45 μM cisplatinos koncentracija (T9 pav.). Nors šiose ląstelėse daugiau susijusių tyrimų neatlikome, manytume, kad AKT-ERK kelio grįžtamasis slopinimas galimai yra būdingas ir kitiems žinduoliams (nepublikuoti duomenys). Kaip bus aptarta diskusijoje, šis atradimas yra svarbus, persvarstant nuo mutacijų onkogenuose priklausomos AKT-ERK sąveikos teoriją.



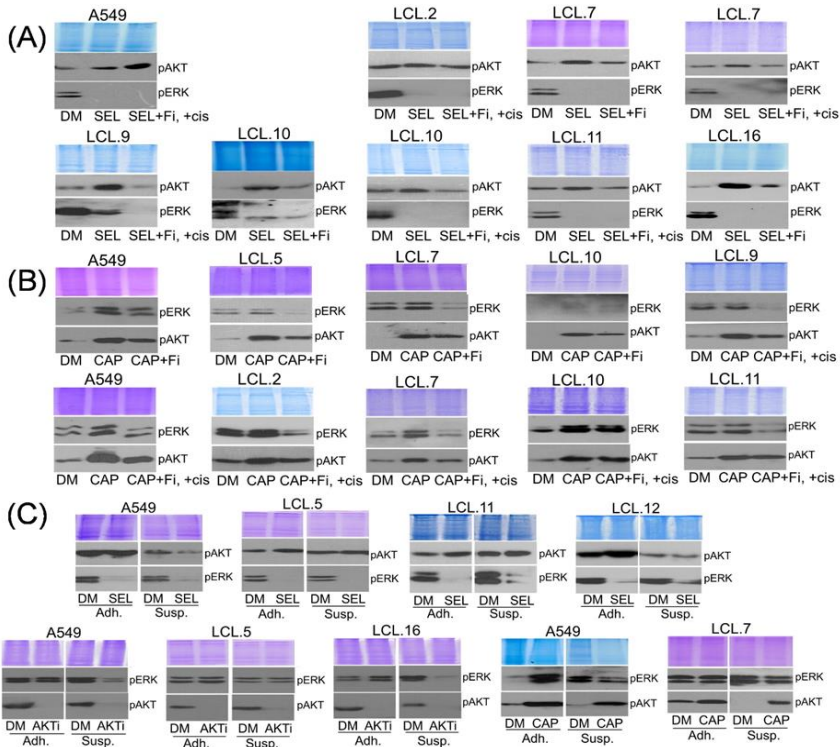
T9 pav. Galima ERK ir AKT signalų kryžminė sąveika iš triušio raumens gautoje ląstelių linijoje Myo. DM – tirpiklio kontrolė (DMSO), SEL – selumetinibas, +cis – cisplatina.

Užląstelių kontaktų vaidmuo bei chemoterapinio vaisto koncentracijos įtaka AKT-ERK sąveikos reguliacijoje

Ankstesniuose šio etapo paveiksluose (T paveiksłai) pateikti rezultatai yra gauti ląstelėse, prilipusiose prie užląstelinio substrato, todėl buvo įdomu pasiaiškinti, kaip gali būti reguliuojama kinazių sąveika cirkuliuojančiose (neprilipusiose) vėžinėse ląstelėse. Šiame tyrime, vis dar naudodami 2D ląstelių kultūras, parodėme, kad FAK slopiklis PF573228 slopino AKT fosforilinimą, kurį sukėlė MEK inhibitorius selumetinibas (T10 pav., A). Panašiai AKT inhibitoriaus kapivasertibo sukeltą ERK fosforilinimo padidėjimą PF573228 sumažino kontrolinėse ir cisplatina paveiktose plaučių vėžio kilmės ląstelėse (T10 pav., B). Tai rodo galimą ląstelių sąveikos su substratu (ir kinazės FAK) vaidmenį, reguliuojant signalinių kelių tarpusavio sąveiką.

Reikėtų paminėti, kad nepavyko gauti AKT fosforilinimo sumažėjimo A549 ląstelėse, vienu metu veikiamose PF573228 ir selumetinibu (T10 pav., A). Šie duomenys atitinka mūsų anksčiau įrodytą FAK slopinimo vaidmenį ERK kinazei A549 ląstelėse: FAK inhibitorius skatino ERK fosforilinimą A549 ląstelėse (pav. R5, C). Taip pat nenormalus ERK1/2 aktyvavimas plaučių vėžio A549 ląstelėse, priešingai nei slopinimas kitose tirtose ląstelių linijose, buvo nustatytas suspensijos sąlygomis (R5 pav., B).

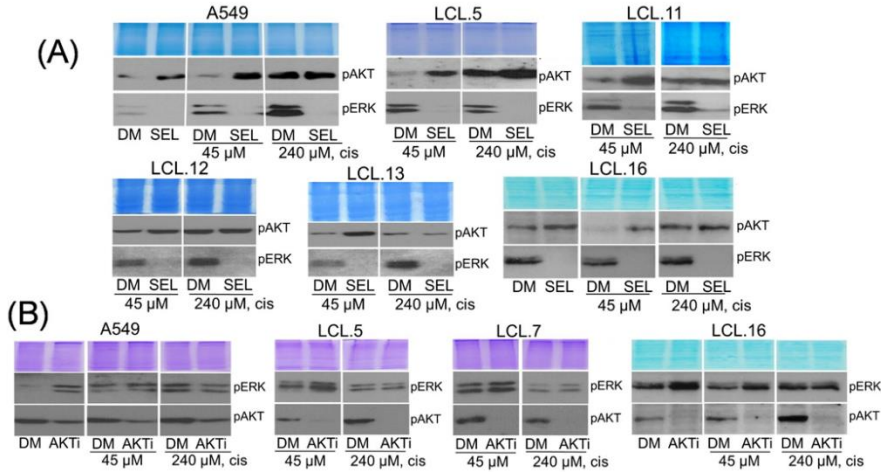
Galiausiai, siekdami imituoti cirkuliuojančių vėžinių ląstelių būseną, inkubavome pasirinktų linijų pavienes ląsteles suspensijoje be jokių ląstelių kontaktų, kaip aprašyta metodų skyriuje, ir veikėme jas vaistais. Kaip matome 10 pav. C, slopiklių poveikis alternatyvių kinazių aktyvacijai suspensinėse ląstelėse buvo silpnas, neutralus ar net priešingas. Šis reiškinys buvo patvirtintas ir selumetinibo (ERK kelio slopinimas), ir AKT VIII inhibitoriaus (AKT kelio slopinimas) atveju. Neprilipusių ląstelių modelyje nebuvo nustatyta jokio AKT ar ERK fosforilinimo padidėjimo po atitinkamai ERK ar AKT inhibitorių veikimo. Taigi, praradus užląstelinius kontaktus, prarandamas ir abipusis kinazių slopinimas, t.y. kinazių tarpusavio sąveika.



T10 pav. Užlįstelių kontaktų įtaka ERK ir AKT signalinių kelių sąveikai. (A) Fokalinės adhezijos kinazės inhibitorius PF573228 (+Fi; 10 μ M) slopina MEK kinazės slopiklio selumetinibo sukeltą AKT fosforilinimo padidėjimą kontrolinėse ir cisplatina paveiktose plaučių vėžio kilmės ląstelėse, išskyrus A549 ląsteles. (B) PF573228 apsaugo nuo AKT slopiklio kapivasertibo sukulto ERK fosforilinimo padidėjimo kontrolinėse ir cisplatina paveiktose plaučių vėžio ląstelėse. (C) Ląstelėms, auginamoms suspensijoje (Susp.) kratymo sąlygose, priešingai nei prilipusioms ląstelėms (Adh.), nestebima alternatyvios kinazės aktyvacija. Parodytos tipinės Western blotų nuotraukos. Kaip kiekio kontrolė pateikti Coomassie mėliu dažyti baltymų geliai. Naudotas 6 valandų trukmės vaistų poveikis. DM – kontrolinis tirpiklis (DMSO), SEL – selumetinibas (10 μ M), +cis – cisplatina (90 μ M), +Fi – FAK slopiklis PF573228 (10 μ M), CAP – kapivasertibas (10 μ M), AKTi – AKT inhibitorius VIII (10 μ M). (© 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).

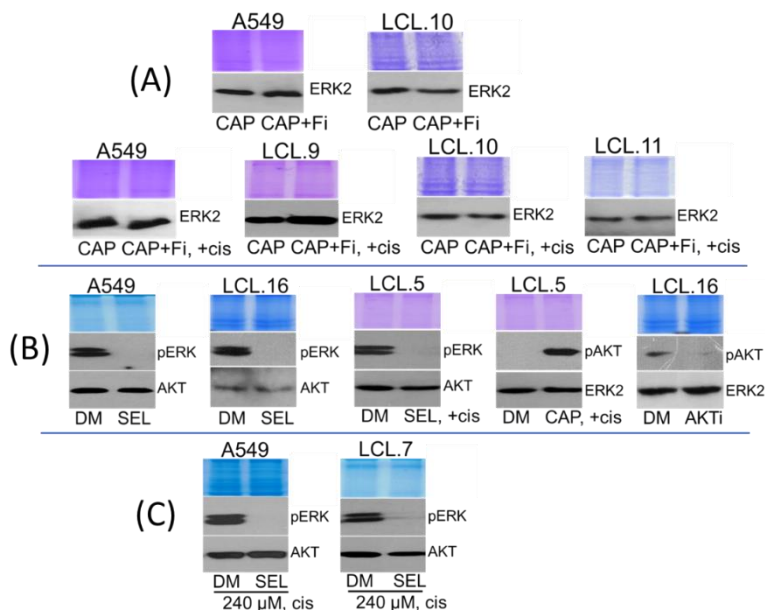
Kitas tyrimų rezultatas, aiškinantis sąveikos tarp kinazių mechanizmus – signalinių kelių sąveika gali priklausyti nuo chemoterapinio stimulo stiprumo: AKT ir ERK1/2 tarpusavio sąveika nestebima ląstelėse, veikiamose didele

cisplatinos koncentracija (240 μM) (T11 pav.). Tokie duomenys gali paremti didelės koncentracijos intranavikinės chemoterapijos idėją kaip alternatyvą mažos koncentracijos intraveniniam dozavimui, kas leistų išvengti sisteminės viso organizmo intoksikacijos (Jiang et al. 2020).



T11 pav. ERK ir AKT tarpusavio sąveika gali priklausyti nuo signalo stiprumo. Ląstelėse, iš anksto paveiktose didele cisplatinos koncentracija (240 μM), priešingai nei kontrolinėse arba maža cisplatinos koncentracija (45 μM) veiktose ląstelėse, nestebima alternatyviosios kinazės AKT aktyvacija reaguojant į ERK slopinimą selumetinibu (A), taip pat ir ERK aktyvacija reaguojant į AKT inhibitorių VIII (B). Pateiktos tipinės Western blot nuotraukos. Kaip kiekio kontrolė parodyti Coomassie mėliu nudažyti baltymų geliai. Naudotas 6 valandų trukmės vaistų poveikis. DM – kontrolinis tirpiklis (DMSO), SEL – selumetinibas (10 μM), +cis – cisplatina, AKTi – AKT inhibitorius VIII (10 μM). (© 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).

Baltymo raiškos tyrimai patvirtino, kad ERK2 ir AKT bendras kiekis nekito aprašytų tyrimų sąlygomis, nei pridėjus FAK slopiklio (T12 pav. A), nei suspensinėse ląstelėse (T12 pav. B), nei padidinus cisplatinos koncentraciją (T12 pav. C).



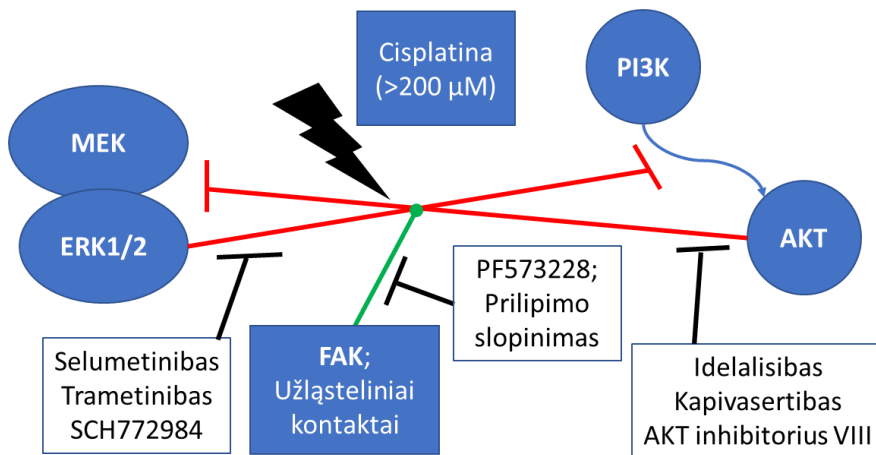
T12 pav. Vaistų ir slopiklių pridėjimas nei kontaktų netekimas neįtakoja ERK2 bei AKT baltymo kiekio, tik fosforilinimą. (A) FAK slopiklis nekeičia ERK2 baltymo kiekio kapivasertibu veiktoje ląstelėse, su ar be cisplatinos. (B) A549 bei kitose iš plaučių vėžio gautose ląstelėse, augintose be užląstelių kontaktų suspensijoje, ERK2 bei AKT baltymo kiekis nepakinta, pridėjus vaistų ar slopiklių. (C) Esant didelei cisplatinos koncentracijai (240 μM), selumetinibo pridėjimas nepakeičia AKT baltymo raiškos. CAP – kapivasertibas (10 μM), +Fi – FAK slopiklis PF573228 (10 μM), DM – kontrolinis tirpiklis (DMSO), SEL – selumetinibas (10 μM), +cis – cisplatinas, AKTi – AKT inhibitorius VIII (10 μM). (© 2023 (CC BY) Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521)).

Taigi galime teigti, kad tirtos ląstelių linijos, gautos iš plaučių vėžio sirgusių pacientų, pasižymi skirtinga morfologija, skirtinga kamieniškumo genų raiška, skirtingais paviršniais baltymiais žymenimis, nevienodu baziniu ERK bei AKT fosforilinimu bei nevienodu atsako į cisplatiną bei taikininis vaistus lygiu. Tačiau visose jose nustatyta ERK ir AKT signalinių kelių negatyvi kryžminė sąveika, t.y. ERK kinazės slopinimas ERK signalinio kelio slopikliais didina AKT fosforilinimą, o AKT kelio slopikliai didina ERK fosforilinimą tiek kontrolinėse, tiek 45-90 μM koncentracijos cisplatinos paveiktose ląstelėse.

Nustatyta, kad sąveikos tarp kinazių buvimas priklauso nuo užląstelių kontaktų, kadangi ląstelėse, praradusiose kontaktus su substratu ir su kitomis

ląstelėmis (pavienėse suspensinėse ląstelėse) slopinančio vienos kinazės poveikio kitai nebuvo. Taip pat, ERK-AKT sąveikai įtakos turi vaisto koncentracija – ląstelių paveikus didele cisplatinos koncentracija (240 μM) kryžminis slopinimas sumažėjo.

Apibendrinant, nustatytas preliminarus ERK ir AKT sąveikos mechanizmas bei panaudota mokslinio tyrimo strategija gali būti atvaizduota schema:



4. REZULTATŲ APTARIMAS IR DISKUSIJA

Užląstelinių kontaktų įtakos įvertinimas ląstelės likimą reguliuojančių kinazių aktyvinimui / išjungimui yra svarbus prognozuojant ląstelių elgseną ir nustatant normalių ir vėžinių ląstelių atsaką į gydymą, priklausomai nuo jų fenotipinės būklės, taip pat jų buvimo vietos organizme. Mūsų tyrimas parodė, kad ląstelėse, praradusiose užląstelinius kontaktus, padidėja stresinių MAP kinazių JNK ir p38 fosforilinimas ir sumažėja išgyvenimo kinazės AKT fosforilinimas, procese dalyvaujant tirozino kinazei FAK. Pažymėtina, kad bendras AKT ir MAPK molekulių kiekis tiriamų procesų metu nepakito. Tačiau MAP kinazės ERK fosforilinimas Myo ir A549 ląstelėse kito skirtingai. Kontakto su ląstelėmis ir substratu atėmimas sukėlė ERK fosforilinimo padidėjimą A549 ląstelėse, tačiau sumažėjo pirminėse plaučių vėžio kilmės ląstelių linijose bei raumeninės kilmės Myo ląstelėse. Šiuo atveju kinazių fosforilinimo skirtumus ląstelėms atsiskyrus nuo substrato lemia įvykiai, vykstantys už FAK aktyvacijos, nes vien šios kinazės slopinimas turėjo tokias pačias pasekmes kaip ir ląstelių prilipimo panaikinimas.

Prilipimo kinazė FAK yra žinoma kaip molekulė, esanti signaliniame kelyje už integrinų ir augimo veiksmų receptorių. Ši nереceptorinė tirozino kinazė reguliuoja įvairias ląstelių funkcijas, jos raiška padidėja sergant įvairiomis žmogaus vėžio formomis (Frame et al. 2010)(McLean et al. 2004). FAK perduoda integrinų aktyvinimo signalą žmogaus embrioninėse kamieninėse ląstelėse ir palaiko jų išlikimą, adheziją prie substrato ir nediferencijuotos būsenos palaikymą (Vitillo et al. 2016). Nuo integrinų priklausomas ląstelių prikibimas reguliuoja FAK fosforilinimą ir aktyvumą. FAK autofosforilinimas Tyr397 yra būtinas integrinų signalizavimui, dėl to keičiasi ląstelių forma, migracija, proliferacija ir diferenciacija. FAK aktyvuoja daugybę tolesnių taikinių, tokių kaip AKT, c-Src, paxilinas, talinas, MDM2 (Tai, Chen, and Shen 2015). Tačiau žinomos ir nuo prilipimo nepriklausomos FAK funkcijos. Nustatyta, kad padidėjęs FAK aktyvinimas neprisitvirtinimo sąlygomis lemia spartesnę navikinių ląstelių augimą (Ward et al. 2013). Netipiniai FAK signaliniai keliai reguliuojant ne-apoptozinę ląstelių mirtį buvo nustatyti epitelinių ląstelių linijoje (Ishikawa et al. 2015a). Šiame darbe parodėme, kad FAK dalyvauja perduodant integrinų sukeltus signalus link MAPK ir AKT raumens kamieninėse ir plaučių vėžio ląstelėse; nustatėme nuo integrinų priklausomą FAK aktyvaciją – jos fosforilinimas sumažėjo atlipintose Myo ir A549 linijų ląstelėse. Farmakologinis FAK slopinimas lėmė MAP kinazių (ERK1/2, JNK, p38) ir išgyvenimo kinazės AKT fosforilinimo pokyčius, kurie sutapo su jų pokyčiais praradus ląstelių prikibimą.

Toliau kalbant apie MAPK ERK, reikia paminėti, kad sukibimo palaikymas ląstelių agregatuose per ląstelių kontaktus suteikė atsparumą *anoikis*. Padidėjęs ERK fosforilinimas agregatuose, palyginti su ląstelėmis suspensijoje, koreliuoja su antiapoptoziniu ERK vaidmeniu mūsų atlipintų ląstelių modeliuose. Tačiau nustatėme, kad ląstelė-substratas kontaktai skirtingai aktyvina ERK plaučių vėžio A549 ir kamieninėse Myo ląstelėse, o tai rodo, kad būtina taikyti skirtingus – slopinimo ir aktyvinimo – metodus skirtingoms ląstelėms, jei taikiniu pasirenkama išgyvenimo kinazė ERK *anoikis* metu. Nuo ląstelė-substratas kontakto nepriklausomas ERK aktyvinimas vėžinėse ląstelėse gali lemti jų atsparumą *anoikis* ir gebėjimą metastazuoti.

Onkogeninių signalinių kelių aktyvavimas yra būtinas įvairių (skirtingų tipų) vėžinių ląstelių išgyvenimui atsiskyrimo nuo substrato metu. A549 – tai mutuooto *KRAS* plaučių vėžio ląstelių linija. *RAS* dažnai mutuoja žmogaus nesmulkiąląstelinio plaučių vėžio (NSCLC) atveju. Gerai žinoma, kad onkogeninis *RAS* aktyvuoja ląstelių išgyvenimo kinazes ERK ir AKT. Tačiau *RAS* tarpininkaujamas signalų perdavimas lemia nuo audinio atsiskyrusių ląstelių išlikimą per skirtingus tolesnius efektorius. Tai gali būti medžiagų apykaitos pokyčiai (Mason et al. 2016), integrinų ir EGFR sąveika (Guha et al. 2019), *anoikis* moduliavimas SRC baltymu (Gao et al. 2019). Panašiai ERK aktyvumo reguliavimas atkibus nuo substrato gali priklausyti nuo ląstelių tipo ir gali skirtis įvairiose ląstelių linijose (H. Zhang et al. 2016).

Vienas iš trijų gerai ištirtų MAPK kelių yra JNK kelias. JNK aktyvuojama reaguojant į įvairius ląstelinis ir užląstelinis stresus, pavyzdžiui uždegiminius citokinus ir ekstremalius aplinkos pokyčius, ir per įvairius mechanizmus dalyvauja ląstelės reakcijose ir apoptozėje. Be to, vis daugiau įrodymų randasi, kad JNK atlieka dvejopas funkcijas ir gali tarpininkauti tiek ląstelių transformacijai, tiek apoptozei. JNK signalai atlieka svarbų vaidmenį reguliuojant vėžinių ląstelių išgyvenamumą, vėžio atsparumą vaistams. Tiksliai JNK funkcija priklauso nuo ląstelių tipo ir konteksto. JNK antiapoptozinis signalas kaip taikiny yra nauja vėžio gydymo strategija (Q. Wu et al. 2019)(S. Lee, Rauch, and Kolch 2020). Panašių duomenų galima rasti ir apie kitą SAPK šeimos MAPK narį – p38. Pavyzdžiui, p38 aktyvinimas baltymų fosfataze PHLPP1, kuri paprastai reguliuoja AKT ir ERK fosforilinimą, buvo pasiūlytas kaip mechanizmas, skatinantis *anoikis* ląstelėms atsiskyrimą nuo ECM (Mason ir kt., 2016). Kitame tyrime pasiūlytas p38 vaidmuo nekrozės indukcijoje transformuotose apoptozei atspariose žmogaus krūties epitelio ląstelėse, dalyvaujant FAK ir TRAIL (Ishikawa et al. 2015b). Mūsų tyrimas atskleidė, kad streso kinazių p38 ir JNK signalinių kelių aktyvavimas plaučių vėžio kilmės ir raumens kamieninėse ląstelėse priklauso

nuo ląstelių ir substrato sąveikos, tačiau vaidmuo reguliuojant *anoikis* gali skirtis. Abiejų streso kinazių fosforilinimo padidėjimas nustatytas A549 ir Myo ląstelėse nesant prikibimo prie substrato. Toks pat poveikis SAPK fosforilinimui buvo pastebėtas slopinant FAK, o tai rodo, kad šių kinazių reguliavime dalyvauja integrinų ir FAK signalai.

Kita vertus, streso kinazių fosforilinimo padidėjimas gali būti susijęs ir su viduląstelinio ROS kiekio padidėjimu atlipintose ląstelėse, kaip buvo įrodyta *anoikis* metu HeLa ir endotelio ląstelėse (Lenassi and Plemenitaš 2006)(Li et al. 1999). Literatūros duomenys rodo, kad SAPK aktyvacija ir jų vaidmuo reguliuojant ląstelių žūtį dėl atkibimo nėra vienareikšmiai. Pavyzdžiui, parodyta, kad streso kinazės atlieka proapoptozinį vaidmenį *anoikis* mechanizmuose daugelyje ląstelių sistemų, bet ne visada (Haun et al. 2018)(Girnius and Davis 2017)(Fortin et al. 2010) (Walsh et al. 2003) (Rosen et al. 2002). Skirtumai pastebimi ir tiriant ląstelių kontaktų įtaką JNK fosforilinimui. Mūsų darbe nustatėme, kad JNK taikinio cJun fosforilinimas tankioje kultūroje slopinamas (R14A pav.). Tai sutampa su duomenimis iš tyrimo su NIH3T3 fibroblastų ląstelių kultūra (Lallemant et al. 1998). Tačiau fosfo-JNK lygis mūsų modelinėse ląstelių linijose yra stimuliuojamas ląstelių tankio (R14B pav.), priešingai nei jų rezultatai, kur JNK ir p38 aktyvaciją slopino ląstelių kontaktavimas. Neatitikimus galima paaiškinti bazinio ar stimuliuojamo JNK fosforilinimo lygio skirtumais atitinkamai mūsų ir jų eksperimentinėse sistemose (kas galimai priklauso nuo naudojamos mitybinės terpės ir jos priedų) ir/arba skirtingomis naudojamomis ląstelių linijomis.

Nepaisant to, šalia duomenų apie SAPK, kaip potencialius *anoikis* tarpininkus, esama skirtingų nuomonių dėl jų vaidmens ląstelių žūtyje. Nors JNK ir p38 kinazės buvo aktyvuotos atlipant epitelio ląstelėms, autoriai, remdamiesi savo tyrimais, padarė išvadą, kad mažai tikėtina, jog JNK arba p38 atlieka tiesioginį vaidmenį užląstelinio kontaktų netekimo sukeltose programuotoje ląstelių mirtyje (Krestow et al. 1999)(Khwaja and Downward 1997). Skirtingai, aktyvuotas p38/JNK signalas slopino apoptozę 3D plaukiojančių mezenchiminių kamieninių ląstelių klasteriuose (Komatsu et al. 2020). Taip pat žinomi p38 ir JNK kinazių aktyvacijos skirtumai (Saranya et al. 2017). Be to, p38 vaidmuo vėžio metastazių proceso metu gali keistis iš antiapoptozinio į proapoptozinį (Barrantes and Nebreda 2012). Dar daugiau, diferenciacijos būsenai selektyvūs streso kinazių vaidmenys gali egzistuoti ląstelėse, patiriančiose *anoikis* (Vachon et al. 2002).

Šiame tyrime tarpląstelinio kontaktų slopinantis poveikis cJun baltymo kiekiui buvo patvirtintas A549 ir Myo ląstelių linijose, kai ląstelės buvo inkubuojamos agregatuose arba auginamos tankioje 2D kultūroje. Ląstelių kontaktai slopino cJun raišką per mechanizmą, susietą su ubikvitino-

proteasomų sistema. Tyrimo rezultatai taip pat atskleidė, kad MAP kinazės JNK aktyvacijos rezultatas gali priklausyti nuo cJun kiekio, kurį savo ruožtu reguliuoja ląstelė-ląstelė kontaktai.

Duomenys apie cJun baltymo kiekio mažėjimą dėl ląstelinių kontaktų A549 ir Myo ląstelėse sutampa su kitų autorių duomenimis, gautais naudojant kitus ląstelių modelius *in vitro*. Didelio tankio arba nepažeistame audinyje cJun buvo randama nedaug, o panaikinus nuo E-kadherino priklausomą ląstelių sukibimą, cJun raiška padidėjo įvairių rūšių ląstelėse, pavyzdžiui, melanocituose, keratinocituose, piktybinėje melanomoje, storosios žarnos karcinomoje, nepažeistame audinyje arba vištų tinklainės, smegenų ar kepenų monosluoksniuose kultūroje (Reisfeld and Vardimon 1994)(Knirsh et al. 2009). Nustatyta, kad pagrindiniai cJun baltymo kiekio ląstelėse reguliatoriai yra E-kadherinas ir mikrovamzdelių tinklas. E-kadherino praradimas arba citoskeleto restruktūrizacija potranskripciniame lygmenyje sukėlė cJun kiekio padidėjimą. cJun kaupimasis buvo realizuojamas transliacijos būdu, o citoskeleto tinklui teko lemiamas vaidmuo. Nustatyta, kad monomerinio α -tubulino, cJun baltymo ir importino-13 sąveika stabilizuoja transkripcijos faktorių, ir yra būtina jo pernešimui į branduolį (B. Spangler et al. 2011)(Barbara Spangler et al. 2012)(Kappelman-Fenzl et al. 2019). Analogiškai, E-kadherino stokojanti melanomos ląstelių linija Mel Im, palyginti su kitais melanomos ląstelių linijų potipiais, tokios reguliacijos nerodė, o tai patvirtina ryšį tarp E-kadherino ir cJun kiekio reguliacijos (B. Spangler et al. 2011).

Taigi, šiame tyrime palyginus baltymų kinazių fosforilinimo profilių skirtingose ląstelių būsenose – atlipusiose, prilipusiose ar agreguotose ląstelėse – išryškėjo užląstelinės aplinkos svarba ir skirtumai tarp ląstelių linijų. Apskritai galima teigti, kad ląstelių sukibimas (su kitomis ląstelėmis arba su substratu) šiuo metu laikomas esminiu veiksniu, lemiančiu ląstelių likimą, be to, kad jis yra gerai žinomas vystymosi signalas. Todėl norint sukurti naujus metodus, kurie pagerintų (biomedicinos pramonėje) arba pablogintų (vėžio tiksliojoje medicinoje) nuo prilipimo nepriklausomą ląstelių išgyvenimą ir dauginimąsi, reikia geriau suprasti signalų perdavimo mechanizmus konkrečiomis aplinkybėmis. Kiekvienu atveju reikia atlikti išsamius tyrimus ir nustatyti *anoikis* molekulinį reguliavimą.

Gilindamiesi į MAPK bei AKT aktyvumo reikšmę plaučių vėžio ląstelėms, jų fenotipui ir atsparumui įvairiems priešvėžiniams vaistams, taip pat planuodami susieti nustatytus dėsningumus su ląstelių paviršiaus ar kitais kamieniškumo žymenimis, nusprendėme atlikti didelės apimties tyrimus, panaudodami vaistus – ERK ir AKT kelio kinazių slopiklius.

Remiamės nuomone, kad į ląstelių būseną (fenotipą) nukreiptas gydymas yra vienas esminių šiuolaikinio vėžio gydymo metodų (Hahn, Bader, Braun, Califano, Clemons, Weissman, et al. 2021). Dažnai ląstelių likimą lemia MEK/ERK ir PI3K/AKT signalinių kelių aktyvumas, kuris nuolat veikiamas specifinių ląstelės vidinių ir išorinių šaltinių. Dabartiniai duomenys aiškiai rodo, kad MAPK ir AKT signaliniai keliai yra pagrindiniai klinikoje naudojami taikiniai, gydant vėžinius susirgimus (S. Lee, Rauch, and Kolch 2020)(Najafi, Ahmadi, and Mortezaee 2019).

Nors vyrauja nuomonė, kad grįžtamasis ryšys tarp AKT ir ERK kelių priklauso nuo ląstelių linijos ir nuo konkrečių onkogeninių mutacijų vėžinėse ląstelėse, mūsų darbe, priešingai, buvo įrodyta, kad abiejų signalinių kelių kryžminis ryšys būdingas visiems ląstelių tipams (bent jau mūsų tirtiems) – PI3K/AKT kelio slopinimas lėmė MAP kinazės ERK aktyvaciją ir, atvirkščiai, MEK/ERK kelio slopinimas didino fosforilintos AKT kiekį tiek kontrolinėse ląstelėse, tiek ląstelėse, veiktose chemoterapiniu vaistu cisplatina.

Atsižvelgdami į tai, kad negenetinė ląstelės būklės moduliacija gali stipriai paveikti ląstelės signalo perdavimą, įskaitant sąveiką tarp signalinių kelių, ir kad ląstelės būseną lemia jautrumą/atsparumą vaistams, tyrėme AKT ir ERK signalinių molekulių sąveiką ląstelėse, kurios neteko kontaktų su substratu. Gali būti, kad cirkuliuojančios naviko ląstelės, pagrindinės metastazių plitimo kaltininkės, gali kitaip reaguoti į priešvėžinius vaistus nei ląstelės, natūraliai apsuptos užląstelinio substrato. Yra žinoma, kad MAP ir AKT kinazių kaskadų aktyvinimas apima reguliacinius signalus, kuriuos inicijuoja užląsteliniai kontaktai, pradedant nuo integrinų ir prilipimo kinazės FAK. Integrinai ir nuo jų priklausomi signaliniai keliai reguliuoja įvairias ląstelių funkcijas, todėl nenuostabu, kad yra susiję ir su įvairiais žmogaus vėžiniais susirgimais. Žemiau integrinų ir augimo veiksmų receptorių, FAK aktyvina daugybę taikinių, įskaitant AKT. Tą parodėme ir šiame darbe, raumens kilmės kamieninėse ir plaučių vėžio kilmės ląstelėse (R4 pav.).

Iš tiesų tyrimai, kuriuose naudotas FAK inhibitorius, taip pat lyginant prie substrato prilipusias ląsteles su ląstelėmis suspensijoje, rodo, kad užląstelinio kontaktų praradimas gali panaikinti kompensacinę ERK ir AKT signalinių kelių sąveiką. Tai svarbu. Cirkuliuojančios ląstelės gali skirtingai reaguoti į priešvėžinius vaistus nei prilipusios, stacionarios ląstelės. Vadinas, supratus signalinius įvykius, kuriais grindžiamas cirkuliuojančių navikinių ląstelių atsakas į priešvėžinius vaistus, galima rasti naujų metodų, kaip įveikti metastazuojančių ląstelių atsparumą gydymui, kuris, tikėtina, yra pagrindė vėžio gydymo nesėkmė.

Mūsų darbas parodė, kad signalinių kelių sąveika priklauso nuo santykinio induktoriaus stiprumo: esant didelėms cisplatinos koncentracijoms, tirtose skirtingose ląstelėse nenustatyta kryžminio alternatyvios kinazės slopinimo. Šia kryptimi literatūroje beveik nieko panašaus neradome, kad galėtume palyginti ir aptarti. Yra tik nuodugnai ištyrinėta AKT signalo integracija su ERK signalo perdavimu ląstelių proliferacijos metu, keičiantis augimo veiksmų koncentracijai (Madsen and Vanhaesebroeck 2020), tačiau ar tai gali būti vienas ir tas pat mechanizmas – sunku pasakyti. Yra atlikta 59 klinikinių tyrimų meta analizė, lyginant cisplatinos mažos ir didelės dozės efektyvumą (Szturz et al. 2019). Nustatyta, kad maža dozė (kas savaitę; iki 50 mg/m²) sukėlė daugiau šalutinių poveikių, o efektyvumas nebuvo didesnis nei didelės dozės (kas 3 savaites; >100 mg/m²). Ilgalaikeje perspektyvoje, nors čia buvo analizuoti galvos ir kaklo auglių tyrimai, gydant spinduline terapija+cisplatina, padaryta išvada, kad didelė koncentracija veikė geriau.

2023 metų vasario 21 dieną buvo publikuotas straipsnis apie cisplatinos mažos (30 μM) ir didelės (300 μM) koncentracijos sukeltų transkripcijos pokyčių tyrimus storžarnės vėžio ląstelėse. Autoriai nustatė, kad maža cisplatinos dozė aktyvuoja autofagiją, kuri apsaugo nuo ląstelių žūties, tuo tarpu didelė cisplatinos koncentracija stipriai sumažino transkripciją apskritai, galimai dėl daugybinių DNR grandinės sąryšių (H. Saini et al. 2023). Šiuos pastebėjimus patvirtina ankstesni tyrimai, kai autofagija buvo parodyta kaip apsauginis plaučių vėžinių ląstelių mechanizmas, gydant cisplatinos ir gemcitabino (H.-M. Wu et al. 2016). Minėtuose straipsniuose mokslininkai pabrėžia, kad nėra patikimų ir kontroliuotų klinikinių tyrimų nei publikacijų apie skirtingų cisplatinos dozių skirtingo veikimo mechanizmus, todėl tebėra didelis poreikis išspręsti šį klausimą, nes cisplatina yra plačiai naudojamas vaistas.

Slopinantis grįžtamasis ryšys tarp signalinių molekulių gali būti viena iš daugelio vėžio nesėkmingo taikininio gydymo priežasčių. Šiuo požiūriu naujų, kliniškai tinkamų vaistų derinių paieška įvairioms/skirtingoms ligos formoms ir būsenoms yra pagrindinis iššūkis. Dvipusis kryžminis RAS/MAPK ir PI3K/mTORC1 kelių slopinimas (kai vieno kelio slopinimas išlaisvina signalus per kitą kelią) buvo tirtas, aptiriamas ir apžvelgiamas įvairių autorių, atskleidžiant įvairius mechanizmus skirtingose vėžio modelinėse sistemose. Tokio grįžtamojo ryšio mechanizmo egzistavimas pripažįstamas kaip natūralus būdas ląstelei apsaugoti nuo toksiškų cheminių junginių (Mendoza, Er, and Blenis 2011)(Aksamitiene, Kiyatkin, and Kholodenko 2012)(Britten 2013). Galima apibendrinti, kad teigiamo ir neigiamo grįžtamojo ryšio kilpos yra dinamiška ir sudėtinga sistema, o

santykinė kiekvienos sąveikos svarba skirtinguose audiniuose ar navikų tipuose gali skirtis ir net priklausyti nuo santykinio signalų stiprumo.

MAPK slopikliai rekomenduojami pacientams, sergantiems nesmulkiažstelinio plaučių vėžiu (Jain et al. 2021), nors tyrimai, kuriuose selumetinibas naudotas kaip monoterapija, nepatvirtino jo veiksmingumo gydant NSCLC (Imyanitov et al. 2020)(Z. Sun et al. 2015). Kanadoje atlikti tyrimai parodė, kad selumetinibas gali būti saugiai derinamas su paklitakseliu ir karboplatina arba pemetreksedu ir cisplatina pacientams, sergantiems pažengusiu ar metastazavusiu NSCLC (Goffin et al. 2019). Tačiau kai kuriais atvejais, pvz. pacientams, sergantiems išplitusiu plaučių vėžiu su *KRAS* mutacija, selumetinibas + docetakselis nepagerino bendro išgyvenamumo (Casaluce et al. 2017). Panašiai, selumetinibo + gemcitabino režimas nebuvo toleruojamas SELECT-3 klinikinio tyrimo metu (Greystoke et al. 2017).

PI3K/AKT/mTOR kelias taip pat yra perspektyvus taikinyš gydant vėžį. AKT signalas yra stebimas ir nesmulkiažstelinio plaučių vėžio ląstelėse (Tan 2020)(M. W. Lee et al. 2011). Šiuo metu kuriama daugiau kaip 50 junginių, nukreiptų į pagrindinius PI3K/AKT/mTOR signalų tinklo komponentus. Daugelis jų buvo išbandyti klinikiniuose tyrimuose, kuriuose dalyvavo pacientai, sergantys įvairiais vėžiniais susirgimais, nes šis kelias yra sutrikęs beveik visuose žmogaus vėžiniuose susirgimuose, įskaitant krūties, storosios žarnos, plaučių, hematologinius piktybinius susirgimus ir kt. Nors mTOR inhibitoriai temsirolimas ir everolimas bei PI3K inhibitoriai idelalisibas ir kopanlisibas buvo patvirtinti FDA klinikiniam naudojimui gydant kai kuriuos vėžinius susirgimus, klinikiniai duomenys rodo, kad naudojant pavienį PI3K kelio slopiklį buvo pasiektas tik santūrus atsakas ir negalėtų būti vadinama gydymu (Alzahrani 2019)(Yang et al. 2019)(Janku, Yap, and Meric-Bernstam 2018)(Pons-Tostivint, Thibault, and Guillermet-Guibert 2017).

Manoma, kad kryžminių ryšių tarp PI3K signalų ir kitų signalinių kelių tyrimai padės ateityje derinti kliniškai svarbių inhibitorių naudojimo strategijas įvairiems navikų tipams (Vasan and Cantley 2022)(L. Zhang et al. 2020). Apskritai turimi duomenys rodo, kad atsparumas vaistams (pirminis ar įgytas) tokiai taikininei terapijai bent iš dalies atsiranda ir yra susijęs su naviko heterogeniškumu, ląstelių būseną, mutaciniu fonu ir kt. Todėl gydant vėžį pirmenybė teikiama slopiklių deriniams (o ne monoterapijai), kurie veikia skirtingas kinazes, atskirai arba kartu su chemoterapija ir (arba) imunoterapija (Meng et al. 2010)(Aksamitiene, Kiyatkin, and Kholodenko 2012)(Sato et al. 2018).

Šiuo metu atliekama vis daugiau klinikinių tyrimų (24 klinikiniai tyrimai iki 2018 m.(Tolcher, Peng, and Calvo 2018)), kuriuose vertinamas PI3K ir MEK inhibitorių derinys sergant įvairiomis vėžio rūšimis, turinčiomis

specifinių molekulinų pakitimų (pvz., RAS/RAF/MEK/ERK kelio aktyvacija), pvz. piktybine melanoma su *BRAF* arba *NRAS* mutacijomis, storosios žarnos, kiaušidžių, kasos ir bazinio tipo krūties vėžiu ir kt, su įvairiais atsako rezultatais (Atefi et al. 2011)(Martinelli et al. 2013)(Renshaw et al. 2013)(Sheppard et al. 2013)(Temraz, Mukherji, and Shamseddine 2015).

Remiantis mūsų tyrimais siūlome, kad kinazių slopiklių derinimo naudingumas galėtų būti vertinamas kiekvienam vėžio tipui ir potipiui pagal MEK/ERK ir PI3K/AKT signalų pobūdį. Duomenys rodo, kad į kraują ar limfinę sistemą patekusios vėžio ląstelės, palyginti su ląstelėmis kietojo naviko viduje, dėl skirtingo reguliavimo turėtų skirtingai reaguoti į taikinius vaistus. Reikia atlikti daugiau tyrimų, kurie būtų nukreipti į išsamesnį baltymų kinazių ERK ir AKT grįžtamojo ryšio reguliavimą lemiančių molekulinų mechanizmų supratimą, esant neprisitvirtinimo būsenai ir skirtingoms vaistų koncentracijoms.

IŠVADOS

1. **Nepriklausomai nuo ląstelės kilmės ar ląstelių tipo, tirtų proteinkinazių bazinis fosforilinimo lygis priklauso, nors ir skirtingai tarp atskirų kinazių, nuo užląstelinių kontaktų.** ERK, JNK ir AKT kinazės ląstelėse yra antiapoptozinės, t. y. apsaugo ląsteles nuo anoikis, kai ląstelės praranda kontaktą su paviršiumi.
2. **To paties signalinio kelio molekulių – JNK ir transkripcijos veiksnio cJun – fosforilinimas ir raiška skirtingai priklauso nuo tarpląstelinių kontaktų.** cJun raiška ir fosforilinimas mažėja, tuo metu kai fosforilintų JNK molekulių daugėja, didėjant ląstelių kultūros tankiui.
3. **Taikininių vaistų, nukreiptų į MAPK ERK ir AKT signalinių kelių molekules, ir jų derinių su įprastiniu vaistu cisplatina poveikis gyvybingumui skiriasi tarp plaučių vėžio kilmės ląstelių linijų vertinant tiek ląstelių proliferaciją, tiek žūtį.** Plaučių vėžio kilmės ląstelės turi aktyvias ERK1/2 ir AKT kinazes. Taikininiai vaistai nukreipti į MAPK ERK ir AKT signalinių kelių molekules efektyviai inhibuoja savo taikinių fosforilinimą visose tirtose ląstelių linijose.
4. **Plaučių vėžio kilmės ląstelėse egzistuoja kompensacinės grįžtamojo ryšio kilpos tarp dviejų signalinių kelių: PI3K/AKT kelio slopinimas skatina MAP kinazės ERK aktyvavimą ir, atvirkščiai, MEK/ERK kelio slopinimas didina fosfo-AKT lygį.** Reiškinyms yra būdingas visoms tirtoms ląstelių linijoms, nepaisant genotipo/fenotipo skirtumų, tiek kontrolėje, tiek cisplatina paveiktose ląstelėse, taip pat naudojant skirtingus šių kinazių slopiklius.
5. **Sąveika tarp ERK ir AKT signalinių kelių priklauso nuo užląstelinių kontaktų – grįžtamas ryšys prarandamas ląstelėms netekus sąveikos su užląsteliniu substratu, taip pat inhibuojant FAK (fokalinę adhezijos kinazę) slopikliu PF573228. Kinazių sąveika gali priklausyti nuo chemoterapinio stimulo stiprumo.**

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Achkar, Iman W, Nabeel Abdulrahman, Hend Al-Sulaiti, Jensa Mariam Joseph, Shahab Uddin, and Fatima Mraiche. 2018. "Cisplatin Based Therapy: The Role of the Mitogen Activated Protein Kinase Signaling Pathway." *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 96. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1471-1>.
2. Agostini, Massimiliano, Paola Tucci, and Gerry Melino. 2011. "Cell Death Pathology: Perspective for Human Diseases." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.081>.
3. Akca, Hakan, Aydin Demiray, Onur Tokgun, and Jun Yokota. 2011. "Invasiveness and Anchorage Independent Growth Ability Augmented by PTEN Inactivation through the PI3K/AKT/NFkB Pathway in Lung Cancer Cells." *Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.01.012>.
4. Aksamitiene, Edita, Anatoly Kiyatkin, and Boris N. Kholodenko. 2012. "Cross-Talk between Mitogenic Ras/MAPK and Survival PI3K/Akt Pathways: A Fine Balance." *Biochemical Society Transactions* 40 (1): 139–46. <https://doi.org/10.1042/BST20110609>.
5. Alzahrani, Ali S. 2019. "PI3K/Akt/MTOR Inhibitors in Cancer: At the Bench and Bedside." *Seminars in Cancer Biology* 59 (December): 125–32. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.009>.
6. Amintas, Samuel, Aurélie Bedel, François Moreau-Gaudry, Julian Boutin, Louis Buscail, Jean Philippe Merlio, Véronique Vendrely, Sandrine Dabernat, and Etienne Buscail. 2020. "Circulating Tumor Cell Clusters: United We Stand Divided We Fall." *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21072653>.
7. Arcaro, Alexandre, and Ana Guerreiro. 2007. "The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Human Cancer: Genetic Alterations and Therapeutic Implications." *Current Genomics* 8 (5): 271–306. <https://doi.org/10.2174/138920207782446160>.
8. Arkun, Yaman. 2016. "Dynamic Modeling and Analysis of the Cross-Talk between Insulin/AKT and MAPK/ERK Signaling Pathways." Edited by Andrea Morrione. *PLOS ONE* 11 (3): e0149684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149684>.
9. Atefi, Mohammad, Erika von Euw, Narsis Attar, Charles Ng, Connie Chu, Deliang Guo, Ramin Nazarian, et al. 2011. "Reversing Melanoma Cross-Resistance to BRAF and MEK Inhibitors by Co-Targeting the AKT/MTOR Pathway." Edited by Johanna M. Brandner. *PLoS ONE* 6 (12): e28973. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028973>.
10. Banks, Mary, Karen Crowell, Amber Proctor, and Brian C. Jensen. 2017. "Cardiovascular Effects of the MEK Inhibitor, Trametinib: A Case Report, Literature Review, and Consideration of Mechanism."

- Cardiovascular Toxicology* 17 (4): 487–93.
<https://doi.org/10.1007/s12012-017-9425-z>.
11. Barrantes, Ivan Del Barco, and Angel R. Nebreda. 2012. “Roles of P38 MAPKs in Invasion and Metastasis.” *Biochemical Society Transactions*.
<https://doi.org/10.1042/BST20110676>.
 12. Basak, Debasish, Scott Arrighi, Yasenya Darwiche, and Subrata Deb. 2021. “Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile.” *Life* 12 (1): 48.
<https://doi.org/10.3390/life12010048>.
 13. Bellacosa, Alfonso, C Chandra Kumar, Antonio Di Cristofano, and Joseph Robert Testa. 2005. “Activation of AKT Kinases in Cancer: Implications for Therapeutic Targeting.” In *Advances in Cancer Research*, 94:29–86. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(05\)94002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(05)94002-5).
 14. Britten, Carolyn D. 2013. “PI3K and MEK Inhibitor Combinations: Examining the Evidence in Selected Tumor Types.” *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 71 (6): 1395–1409.
<https://doi.org/10.1007/s00280-013-2121-1>.
 15. Brognard, J., A. S. Clark, Y. Ni, and P. A. Dennis. 2001. “Akt/Pbrotein Kinase B Is Constitutively Active in Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Promotes Cellular Survival and Resistance to Chemotherapy and Radiation.” *Cancer Research*.
 16. Cabanos, Heidie Frisco, and Aaron N. Hata. 2021. “Emerging Insights into Targeted Therapy-Tolerant Persister Cells in Cancer.” *Cancers* 13 (11): 2666. <https://doi.org/10.3390/cancers13112666>.
 17. Cao, Zhe, Qianjin Liao, Min Su, Kai Huang, Junfei Jin, and Deliang Cao. 2019. “AKT and ERK Dual Inhibitors: The Way Forward?” *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.05.025>.
 18. Casaluce, Francesca, Assunta Sgambato, Paolo Maione, Paola Claudia Sacco, Giuseppe Santabarbara, and Cesare Gridelli. 2017. “Selumetinib for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer.” *Expert Opinion on Investigational Drugs* 26 (8): 973–84.
<https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1351543>.
 19. Chen, Chia-Hung, Te-Chun Hsia, Ming-Hsin Yeh, Tsung-Wei Chen, Yun-Ju Chen, Jung-Tsu Chen, Ya-Ling Wei, Chih-Yen Tu, and Wei-Chien Huang. 2017. “MEK Inhibitors Induce Akt Activation and Drug Resistance by Suppressing Negative Feedback ERK-Mediated HER2 Phosphorylation at Thr701.” *Molecular Oncology* 11 (9): 1273–87.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12102>.
 20. Choi, Cheolwon, Junyeob Kwon, Sunyoung Lim, and David M. Helfman. 2016. “Integrin B1, Myosin Light Chain Kinase and Myosin IIA Are Required for Activation of PI3K-AKT Signaling Following MEK Inhibition in Metastatic Triple Negative Breast Cancer.” *Oncotarget* 7 (39): 63466–87.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11525>.

21. Chu, Nam, Antonieta L. Salguero, Albert Z. Liu, Zan Chen, Daniel R. Dempsey, Scott B. Ficarro, William M. Alexander, et al. 2018. "Akt Kinase Activation Mechanisms Revealed Using Protein Semisynthesis." *Cell* 174 (4): 897-907.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.003>.
22. Cicenás, Jonas, and Asta Račienė. 2021. "Anti-Cancer Drugs Targeting Protein Kinases Approved by FDA in 2020." *Cancers* 13 (5): 947. <https://doi.org/10.3390/cancers13050947>.
23. Cicenás, Jonas, Egle Zalyte, Arnas Rimkus, Dalius Dapkus, Remigijus Noreika, and Sigitas Urbonavicius. 2017. "JNK, P38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer." *Cancers* 10 (1): 1. <https://doi.org/10.3390/cancers10010001>.
24. Cohen MH, Johnson JR, Chen YF, Sridhara R, Pazdur R. 2005. "FDA Drug Approval Summary: Erlotinib (Tarceva) Tablets." *Oncologist* 10 (7): 461–66.
25. Coleman, Niamh, Justin T. Moyers, Alice Harbery, Igor Vivanco, and Timothy A. Yap. 2021. "Clinical Development of AKT Inhibitors and Associated Predictive Biomarkers to Guide Patient Treatment in Cancer Medicine." *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S305068>.
26. Danial, Nika N., and David M. Hockenbery. 2018. "Cell Death." In *Hematology*, Seventh Ed, 186–96. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35762-3.00018-4>.
27. Dasari, Shaloam, and Paul Bernard Tchounwou. 2014a. "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action." *European Journal of Pharmacology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
28. Davis, William J, Peter Z Lehmann, and Weimin Li. 2015. "Nuclear PI3K Signaling in Cell Growth and Tumorigenesis." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00024>.
29. Degirmenci, Ufuk, Mei Wang, and Jiancheng Hu. 2020. "Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy." *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells9010198>.
30. Derda, Ratmir, Anna Laromaine, Akiko Mammoto, Sindy K.Y. Tang, Tadanori Mammoto, Donald E. Ingber, and George M. Whitesides. 2009. "Paper-Supported 3D Cell Culture for Tissue-Based Bioassays." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910666106>.
31. Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch. 2007. "MAP Kinase Signalling Pathways in Cancer." *Oncogene* 26 (22): 3279–90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>.
32. Du, Guan-Hua. 2018a. *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Singapore: Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8022-7>.
33. Dzobo, Kevin, Chelene Ganz, Nicholas Ekow Thomford, and Dimakatso Alice Senthebane. 2021. "Cancer Stem Cell Markers in

- Relation to Patient Survival Outcomes: Lessons for Integrative Diagnostics and Next-Generation Anticancer Drug Development.” *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 25 (2): 81–92. <https://doi.org/10.1089/omi.2020.0185>.
34. Edwards, Lincoln A., Maite Verreault, Brian Thiessen, Wieslawa H. Dragowska, Yanping Hu, Juliana H.F. Yeung, Shoukat Dedhar, and Marcel B. Bally. 2006. “Combined Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Results in Synergistic Effects in Glioblastoma Cells.” *Molecular Cancer Therapeutics* 5 (3): 645–54. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0099>.
 35. Eramo, A., T. L. Haas, and R. De Maria. 2010. “Lung Cancer Stem Cells: Tools and Targets to Fight Lung Cancer.” *Oncogene* 29 (33): 4625–35. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.207>.
 36. Faes, Seraina, and Olivier Dormond. 2015. “PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (9): 21138–52. <https://doi.org/10.3390/ijms160921138>.
 37. Fennell, Katie A., Dane Vassiliadis, Enid Y. N. Lam, Luciano G. Martelotto, Jesse J. Balic, Sebastian Hollizeck, Tom S. Weber, et al. 2022. “Non-Genetic Determinants of Malignant Clonal Fitness at Single-Cell Resolution.” *Nature* 601 (7891): 125–31. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04206-7>.
 38. Fortin, Jessica, Alexandre Patenaude, Réna G. Deschesnes, Marie France Côté, Eric Petitclerc, and René C-Gaudreault. 2010. “ASK1-P38 Pathway Is Important for Anoikis Induced by Microtubule- Targeting Aryl Chloroethylureas.” *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.18433/j31g6c>.
 39. Frame, Margaret C., Hitesh Patel, Bryan Serrels, Daniel Lietha, and Michael J. Eck. 2010. “The FERM Domain: Organizing the Structure and Function of FAK.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2996>.
 40. Freyer, David R., Lu Chen, Mark D. Krailo, Kristin Knight, Doojduen Villaluna, Bonnie Bliss, Brad H. Pollock, et al. 2017. “Effects of Sodium Thiosulfate versus Observation on Development of Cisplatin-Induced Hearing Loss in Children with Cancer (ACCL0431): A Multicentre, Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial.” *The Lancet Oncology*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30625-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30625-8).
 41. Fritsche-Guenther, Raphaela, Franziska Witzel, Stefan Kempa, Tilman Brummer, Christine Sers, and Nils Blüthgen. 2016. “Effects of RAF Inhibitors on PI3K/AKT Signalling Depend on Mutational Status of the RAS/RAF Signalling Axis.” *Oncotarget* 7 (7): 7960–69. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6959>.
 42. Gao, Ziran, Guo Sheng Zhao, Yangfan Lv, Dongbin Peng, Xuefeng Tang, Hanxiang Song, and Qiao Nan Guo. 2019. “Anoikis-Resistant Human Osteosarcoma Cells Display Significant Angiogenesis by

- Activating the Src Kinase-Mediated MAPK Pathway.” *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6827>.
43. Garrington, Timothy P., and Gary L. Johnson. 1999. “Organization and Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways.” *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80028-3](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80028-3).
 44. Girnius, Nomedá, and Roger J. Davis. 2017. “JNK Promotes Epithelial Cell Anoikis by Transcriptional and Post-Translational Regulation of BH3-Only Proteins.” *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.067>.
 45. Goffin, J. R., G. Nicholas, M. Mates, D. Tu, E. Chen, S. A. Laurie, R. Juergens, et al. 2019. “Canadian Cancer Trials Group (CCTG) IND215: A Phase Ib Study of Selumetinib in Patients with Untreated Advanced or Metastatic NSCLC Who Are Receiving Standard Chemotherapy Regimens.” *Investigational New Drugs* 37 (3): 498–506. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0680-z>.
 46. Gottschling, Sandra, Esther Herpel, Wilfried E.E. Eberhardt, David F. Heigener, Jürgen R. Fischer, Claus Henning Köhne, Cornelius Kortsik, et al. 2012. “The Gefitinib Long-Term Responder (LTR)-A Cancer Stem-like Cell Story? Insights from Molecular Analyses of German Long-Term Responders Treated in the IRESSA Expanded Access Program (EAP).” *Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.03.003>.
 47. Grandori, Carla, and Christopher J. Kemp. 2018. “Personalized Cancer Models for Target Discovery and Precision Medicine.” *Trends in Cancer* 4 (9): 634–42. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.07.005>.
 48. Greystoke, Alastair, Nicola Steele, Hendrik Tobias Arkenau, Fiona Blackhall, Noor Md Haris, Colin R. Lindsay, Raffaele Califano, et al. 2017. “SELECT-3: A Phase I Study of Selumetinib in Combination with Platinum-Doublet Chemotherapy for Advanced NSCLC in the First-Line Setting.” *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.271>.
 49. Guha, Deblina, Taniya Saha, Sayantan Bose, Sreeparna Chakraborty, Subhanki Dhar, Poulami Khan, Arghya Adhikary, Tanya Das, and Gaurisankar Sa. 2019. “Integrin-EGFR Interaction Regulates Anoikis Resistance in Colon Cancer Cells.” *Apoptosis*. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01573-5>.
 50. Guo, Qianqian, Liwei Liu, Zelong Chen, Yannan Fan, Yang Zhou, Ziqiao Yuan, and Wenzhou Zhang. 2022. “Current Treatments for Non-Small Cell Lung Cancer.” <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.945102>.
 51. Hahn, William C., Joel S. Bader, Theodore P. Braun, Andrea Califano, Paul A. Clemons, Brian J. Druker, Andrew J. Ewald, et al. 2021. “An Expanded Universe of Cancer Targets.” *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.020>.

52. Han, Jing, Yang Liu, Sen Yang, Xuan Wu, Hongle Li, and Qiming Wang. 2021. "MEK Inhibitors for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer." *Journal of Hematology & Oncology* 14 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-01025-7>.
53. Haun, Florian, Simon Neumann, Lukas Peintner, Katrin Wieland, Jüri Habicht, Carsten Schwan, Kristine Østevold, et al. 2018. "Identification of a Novel Anoikis Signalling Pathway Using the Fungal Virulence Factor Gliotoxin." *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05850-w>.
54. Hedayat, Mohaddeseh, Reza Jafari, and Naime Majidi Zolbanin. 2022. "Selumetinib: A Selective MEK1 Inhibitor for Solid Tumor Treatment." *Clinical and Experimental Medicine*, February. <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00783-z>.
55. Heigener, David F., David R. Gandara, and Martin Reck. 2015. "Targeting of MEK in Lung Cancer Therapeutics." *The Lancet Respiratory Medicine* 3 (4): 319–27. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00026-0).
56. Hesketh, Paul J., Sualp Tansan, Priscilla B. Caguioa, Ann Hesketh, Rita Blanchard, Nancy Dimartino, and Desmond Carney. 1993. "Treatment of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer with Very High-Dose Cisplatin Combined with Etoposide and Mitomycin C." *Cancer* 71 (3): 717–20. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930201\)71:3<717::AID-CNCR2820710310>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930201)71:3<717::AID-CNCR2820710310>3.0.CO;2-G).
57. Hickman, John A., Ralph Graeser, Ronald de Hoogt, Suzana Vidic, Catarina Brito, Matthias Gutekunst, Heiko van der Kuip, and Imi Predect consortium. 2014. "Three-Dimensional Models of Cancer for Pharmacology and Cancer Cell Biology: Capturing Tumor Complexity in Vitro/Ex Vivo." *Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1002/biot.201300492>.
58. Hirai, Hiroshi, Hiroshi Sootome, Yoko Nakatsuru, Katsuyoshi Miyama, Shunsuke Taguchi, Kyoko Tsujioka, Yoko Ueno, et al. 2010. "MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs in Vitro and in Vivo." *Molecular Cancer Therapeutics* 9 (7): 1956–67. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1012>.
59. Hook, Lilian A. 2012. "Stem Cell Technology for Drug Discovery and Development." *Drug Discovery Today* 17 (7–8): 336–42. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.11.001>.
60. Iizuka-Ohashi, Mahiro, Motoki Watanabe, Mamiko Sukeno, Mie Morita, Ngoc Thi Hong Hoang, Takahiro Kuchimaru, Shinae Kizaka-Kondoh, et al. 2018. "Blockage of the Mevalonate Pathway Overcomes the Apoptotic Resistance to MEK Inhibitors with Suppressing the Activation of Akt in Cancer Cells." *Oncotarget* 9 (28): 19597–612. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24696>.

61. Imyanitov, Evgeny N., Evgeny V. Levchenko, Ekatherina S. Kuligina, and Sergey V. Orlov. 2020. "Treating Non-Small Cell Lung Cancer with Selumetinib: An up-to-Date Drug Evaluation." *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1080/14656566.2020.1798930>.
62. Iorio, Francesco, Theo A. Knijnenburg, Daniel J. Vis, Graham R. Bignell, Michael P. Menden, Michael Schubert, Nanne Aben, et al. 2016. "A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer." *Cell* 166 (3): 740–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>.
63. Ishikawa, F., K. Ushida, K. Mori, and M. Shibnuma. 2015a. "Loss of Anchorage Primarily Induces Non-Apoptotic Cell Death in a Human Mammary Epithelial Cell Line under Atypical Focal Adhesion Kinase Signaling." *Cell Death and Disease*. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.583>.
64. Jain, Anisha S., Ashwini Prasad, Sushma Pradeep, Chandan Dharmashekar, Raghu Ram Achar, Silina Ekaterina, Stupin Victor, et al. 2021. "Everything Old Is New Again: Drug Repurposing Approach for Non-Small Cell Lung Cancer Targeting MAPK Signaling Pathway." *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.741326>.
65. Janku, Filip, Timothy A. Yap, and Funda Meric-Bernstam. 2018. "Targeting the PI3K Pathway in Cancer: Are We Making Headway?" *Nature Reviews. Clinical Oncology* 15 (5): 273–91. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.28>.
66. Jeanson, Arnaud, Arnaud Boyer, Laurent Greillier, Pascale Tomasini, and Fabrice Barlesi. 2019. "Therapeutic Potential of Trametinib to Inhibit the Mutagenesis by Inactivating the Protein Kinase Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer." *Expert Review of Anticancer Therapy* 19 (1): 11–17. <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1554440>.
67. Jiang, Wenqing, Xiaoping Yang, Xuekun Wang, Yue Li, Xinai Yang, Na Wang, and Bin Yin. 2020. "Bronchoscopic Intratumoral Injections of Cisplatin and Endostar as Concomitants of Standard Chemotherapy to Treat Malignant Central Airway Obstruction." *Postgraduate Medical Journal*, October, [postgradmedj-2020-138823](https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138823). <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-138823>.
68. Jong, Eric D., Irina C.W. Chan, and Aurora M. Nedelcu. 2019a. "A Model-System to Address the Impact of Phenotypic Heterogeneity and Plasticity on the Development of Cancer Therapies." *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00842>.
69. Kajstura, Jan, Marcello Rota, Sean R. Hall, Toru Hosoda, Domenico D'Amario, Fumihiko Sanada, Hanqiao Zheng, et al. 2011a. "Evidence for Human Lung Stem Cells." *New England Journal of Medicine* 364 (19): 1795–1806. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1101324>.
70. Kalvelyte, Audrone, Natalija Krestnikova, Aurimas Stulpinas, Virginija Bukelskiene, Daiva Bironaite, Daiva Baltriukiene, and Ausra Imbrasaitė. 2013. "Long-Term Muscle-Derived Cell Culture:

- Multipotency and Susceptibility to Cell Death Stimuli.” *Cell Biology International* 37 (4): 292–304. <https://doi.org/10.1002/cbin.10036>.
71. Kalvelytė, Audronė V., Aušra Imbrasaitė, Natalija Krestnikova, and Aurimas Stulpinas. 2017a. “Adult Stem Cells and Anticancer Therapy.” In *Advances in Molecular Toxicology*, 11:123–202. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812522-9.00004-X>.
 72. Kanda, Yuki, Ayami Mizuno, Teruaki Takasaki, Ryosuke Satoh, Kanako Hagihara, Takashi Masuko, Yuichi Endo, Genzoh Tanabe, and Reiko Sugiura. 2021. “Down-regulation of Dual-specificity Phosphatase 6, a Negative Regulator of Oncogenic ERK Signaling, by ACA-28 Induces Apoptosis in NIH/3T3 Cells Overexpressing HER2/ErbB2.” *Genes to Cells* 26 (2): 109–16. <https://doi.org/10.1111/gtc.12823>.
 73. Kappelmann-Fenzl, Melanie, Silke Kuphal, Rosemarie Krupar, Dirk Schadendorf, Viktor Umansky, Lily Vardimon, Claus Hellerbrand, and Anja Katrin Bosserhoff. 2019. “Complex Formation with Monomeric α -Tubulin and Importin 13 Fosters c-Jun Protein Stability and Is Required for c-Jun’s Nuclear Translocation and Activity.” *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers11111806>.
 74. Ke, Bowen, Mao Tian, Jingjing Li, Bo Liu, and Gu He. 2016. “Targeting Programmed Cell Death Using Small-Molecule Compounds to Improve Potential Cancer Therapy.” *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.21398>.
 75. Khatlani, T. S., M. Wislez, M. Sun, H. Srinivas, K. Iwanaga, L. Ma, A. E. Hanna, et al. 2007. “C-Jun N-Terminal Kinase Is Activated in Non-Small-Cell Lung Cancer and Promotes Neoplastic Transformation in Human Bronchial Epithelial Cells.” *Oncogene* 26 (18): 2658–66. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210050>.
 76. Khwaja, Asim, and Julian Downward. 1997. “Lack of Correlation between Activation of Jun-NH2-Terminal Kinase and Induction of Apoptosis after Detachment of Epithelial Cells.” *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.4.1017>.
 77. Kim, Eun Kyung, and Eui-Ju Choi. 2010. “Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1802 (4): 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>.
 78. Kim, Jae-Young, Eric A. Welsh, Bin Fang, Yun Bai, Fumi Kinose, Steven A. Eschrich, John M. Koomen, and Eric B. Haura. 2016. “Phosphoproteomics Reveals MAPK Inhibitors Enhance MET- and EGFR-Driven AKT Signaling in KRAS -Mutant Lung Cancer.” *Molecular Cancer Research* 14 (10): 1019–29. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0506>.
 79. Kim-Campbell, Nahmah, Hernando Gomez, and Hülya Bayir. 2019. “Cell Death Pathways.” In *Critical Care Nephrology*, Third Edit, 113-

- 121.e2. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00020-0>.
80. Knirsh, Revital, Iris Ben-Dror, Barbara Spangler, Gideon D. Matthews, Silke Kuphal, Anja K. Bosserhoff, and Lily Vardimon. 2009. "Loss of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Contacts Activates a Novel Mechanism for up-Regulation of the Proto-Oncogene c-Jun." *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-12-1196>.
81. Komatsu, Nao, Mikihito Kajiya, Shin Morimoto, Souta Motoike, Hiroki Yoshii, Tomoyuki Iwata, Kazuhisa Ouhara, Shinji Matsuda, Noriyoshi Mizuno, and Hidemi Kurihara. 2020. "Cox2-Mediated PGE2 Production via P38/JNK-c-Fos Signaling Inhibits Cell Apoptosis in 3D Floating Culture Clumps of Mesenchymal Stem Cell/Extracellular Matrix Complexes." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.100>.
82. Krestnikova, Natalija, Aurimas Stulpinas, Ausra Imbrasaite, Goda Sinkeviciute, and Audrone Valerija Kalvelyte. 2015. "JNK Implication in Adipocyte-like Cell Death Induced by Chemotherapeutic Drug Cisplatin." *The Journal of Toxicological Sciences* 40 (1): 21–32. <https://doi.org/10.2131/jts.40.21>.
83. Krestow, Julia K., Janusz Rak, Jorge Filmus, and Robert S. Kerbel. 1999. "Functional Dissociation of Anoikis-like Cell Death and Activity of Stress Activated Protein Kinase." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0863>.
84. Lallemand, Dominique, Jonathan Ham, Serge Garbay, Latifa Bakiri, François Traincard, Odile Jeannequin, Curt M. Pfarr, and Moshe Yaniv. 1998. "Stress-Activated Protein Kinases Are Negatively Regulated by Cell Density." *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5615>.
85. Lazennec, Gwendal, and Paula Y. Lam. 2016. "Recent Discoveries Concerning the Tumor - Mesenchymal Stem Cell Interactions." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1866 (2): 290–99. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.10.004>.
86. Lee, Ho Young, Seung Hyun Oh, Young Ah Suh, Jin Hyen Baek, Vali Papadimitrakopoulou, Suyun Huang, and Waun Ki Hong. 2005. "Response of Non-Small Cell Lung Cancer Cells to the Inhibitors of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt- and MAPK Kinase 4/c-Jun NH 2-Terminal Kinase Pathways: An Effective Therapeutic Strategy for Lung Cancer." *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0009>.
87. Lee, Jr., John T., Linda S. Steelman, William H. Chappell, and James A. McCubrey. 2008. "Akt Inactivates ERK Causing Decreased Response to Chemotherapeutic Drugs in Advanced CaP Cells." *Cell Cycle* 7 (5): 631–36. <https://doi.org/10.4161/cc.7.5.5416>.
88. Lee, Myoung W., Dae S. Kim, Joo H. Lee, Bum S. Lee, Soo H. Lee, Hye L. Jung, Ki W. Sung, Heung T. Kim, Keon H. Yoo, and Hong H.

- Koo. 2011. "Roles of AKT1 and AKT2 in Non-Small Cell Lung Cancer Cell Survival, Growth, and Migration." *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02025.x>.
89. Lee, Shannon, Jens Rauch, and Walter Kolch. 2020. "Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (3): 1102. <https://doi.org/10.3390/ijms21031102>.
 90. Lemjabbar-Alaoui, Hassan, Omer U.I. Hassan, Yi-Wei Yang, and Petra Buchanan. 2015. "Lung Cancer: Biology and Treatment Options." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1856 (2): 189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
 91. Lenassi, Metka, and Ana Plemenitaš. 2006. "The Role of P38 MAP Kinase in Cancer Cell Apoptosis." *Radiology and Oncology*.
 92. Li, Arthur E., Hideaki Ito, Ilsa I. Rovira, Kyung Soo Kim, Kazuyo Takeda, Zu Yi Yu, Victor J. Ferrans, and Toren Finkel. 1999. "A Role for Reactive Oxygen Species in Endothelial Cell Anoikis." *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.85.4.304>.
 93. Liu, Bo, Hsiao Man Ivy Yu, Jiaoti Huang, and Wei Hsu. 2008. "Co-Opted JNK/SAPK Signaling in Wnt/ β -Catenin-Induced Tumorigenesis." *Neoplasia*. <https://doi.org/10.1593/neo.08548>.
 94. Liu, Tie Cheng, Xin Jin, Yan Wang, and Ke Wang. 2017. "Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Lung Cancer and Targeted Therapies." *American Journal of Cancer Research* 7 (2): 187–202.
 95. Liu, Xingde, Wenxiu Yang, Zhizhong Guan, Wenfeng Yu, Bin Fan, Ningzhi Xu, and D. Joshua Liao. 2018. "There Are Only Four Basic Modes of Cell Death, Although There Are Many Ad-Hoc Variants Adapted to Different Situations." *Cell & Bioscience* 8 (1): 6. <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0206-6>.
 96. Lv, Donglai, Zongtao Hu, Lin Lu, Husheng Lu, and Xiuli Xu. 2017. "Three-Dimensional Cell Culture: A Powerful Tool in Tumor Research and Drug Discovery." *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>.
 97. Madsen, Ralitsa R., and Bart Vanhaesebroeck. 2020. "Cracking the Context-Specific PI3K Signaling Code." *Science Signaling*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aay2940>.
 98. Maik-Rachline, Galia, and Rony Seger. 2016. "The ERK Cascade Inhibitors: Towards Overcoming Resistance." *Drug Resistance Updates* 25 (March): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.12.001>.
 99. Majeed, Umair, Rami Manochakian, Yujie Zhao, and Yanyan Lou. 2021. "Targeted Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Current Advances and Future Trends." *Journal of Hematology & Oncology* 14 (1): 108. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01121-2>.
 100. Manohar, Sandhya, and Nelson Leung. 2018a. "Cisplatin Nephrotoxicity: A Review of the Literature." *Journal of Nephrology* 31 (1): 15–25. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>.

101. Manstein, Viktoria, Chul Yang, Diane Richter, Natalia Delis, Vida Vafaizadeh, and Bernd Groner. 2014. "Resistance of Cancer Cells to Targeted Therapies Through the Activation of Compensating Signaling Loops." *Current Signal Transduction Therapy* 8 (3): 193–202. <https://doi.org/10.2174/1574362409666140206221931>.
102. Martinelli, Erika, Teresa Troiani, Elena D’Aiuto, Floriana Morgillo, Donata Vitagliano, Anna Capasso, Sarah Costantino, et al. 2013. "Antitumor Activity of Pimasertib, a Selective MEK 1/2 Inhibitor, in Combination with PI3K/MTOR Inhibitors or with Multi-Targeted Kinase Inhibitors in Pimasertib-Resistant Human Lung and Colorectal Cancer Cells." *International Journal of Cancer* 133 (9): 2089–2101. <https://doi.org/10.1002/ijc.28236>.
103. Mason, J. A., C. A. Davison-Versagli, A. K. Leliaert, D. J. Pape, C. McCallister, J. Zuo, S. M. Durbin, C. L. Buchheit, S. Zhang, and Z. T. Schafer. 2016. "Oncogenic Ras Differentially Regulates Metabolism and Anoikis in Extracellular Matrix-Detached Cells." *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.15>.
104. McCubrey, James A., Linda S. Steelman, William H. Chappell, Stephen L. Abrams, Giuseppe Montalto, Melchiorre Cervello, Ferdinando Nicoletti, et al. 2012. "Mutations and Deregulation of Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/Mtor Cascades Which Alter Therapy Response." *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.652>.
105. McLean, Gordon W., Noboru H. Komiyama, Bryan Serrels, Hidefumi Asano, Louise Reynolds, Francesco Conti, Kairbaan Hodivala-Dilke, et al. 2004. "Specific Deletion of Focal Adhesion Kinase Suppresses Tumor Formation and Blocks Malignant Progression." *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.316304>.
106. Meister, Melanie, Ana Tomasovic, Antje Banning, and Ritva Tikkanen. 2013. "Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Re-count." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4854–84. <https://doi.org/10.3390/ijms14034854>.
107. Mello, Ramon Andrade de, Nathália Moisés Neves, Hakaru Tadokoro, Giovanna Araújo Amaral, Pedro Castelo-Branco, and Victor André de Almeida Zia. 2020. "New Target Therapies in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Review of the Literature and Future Perspectives." *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm9113543>.
108. Melosky, Barbara, Paul Wheatley-Price, Rosalyn A. Juergens, Adrian Sacher, Natasha B. Leighl, Ming-Sound Tsao, Parneet Cheema, et al. 2021. "The Rapidly Evolving Landscape of Novel Targeted Therapies in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer." *Lung Cancer* 160 (June): 136–51. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.06.002>.
109. Mendoza, Michelle C., E. Emrah Er, and John Blenis. 2011. "The Ras-ERK and PI3K-MTOR Pathways: Cross-Talk and Compensation."

110. Meng, Jieru, Bingbing Dai, Bingliang Fang, B. Nebiyou Bekele, William G. Bornmann, Duoli Sun, Zhenghong Peng, et al. 2010. “Combination Treatment with MEK and AKT Inhibitors Is More Effective than Each Drug Alone in Human Non-Small Cell Lung Cancer In Vitro and In Vivo.” Edited by Eric J. Bernhard. *PLoS ONE* 5 (11): e14124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014124>.
111. Messori, Luigi, and Antonello Merlino. 2016a. “Cisplatin Binding to Proteins: A Structural Perspective.” *Coordination Chemistry Reviews* 315 (May): 67–89. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.01.010>.
112. Metro, Giulio, Rita Chiari, Alice Baldi, Verena De Angelis, Vincenzo Minotti, and Lucio Crinò. 2013. “Selumetinib: A Promising Pharmacologic Approach for KRAS-Mutant Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Future Oncology* 9 (2): 167–77. <https://doi.org/10.2217/fon.12.198>.
113. Misale, Sandra, Jackson P. Fatherree, Eliane Cortez, Chendi Li, Samantha Bilton, Daria Timonina, David T. Myers, et al. 2019. “KRAS G12C NSCLC Models Are Sensitive to Direct Targeting of KRAS in Combination with PI3K Inhibition.” *Clinical Cancer Research* 25 (2): 796–807. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0368>.
114. Moelling, Karin, Karen Schad, Magnus Bosse, Sven Zimmermann, and Marc Schweneker. 2002. “Regulation of Raf-Akt Cross-Talk.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (34): 31099–106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111974200>.
115. Moschos, Stergios J., Ryan J. Sullivan, Wen-Jen Hwu, Ramesh K. Ramanathan, Alex A. Adjei, Peter C. Fong, Ronnie Shapira-Frommer, et al. 2018. “Development of MK-8353, an Orally Administered ERK1/2 Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors.” *JCI Insight* 3 (4). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92352>.
116. Murphy, Leon O., Jeffrey P. MacKeigan, and John Blenis. 2004. “A Network of Immediate Early Gene Products Propagates Subtle Differences in Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Amplitude and Duration.” *Molecular and Cellular Biology* 24 (1): 144–53. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.144-153.2004>.
117. Najafi, Masoud, Amirhossein Ahmadi, and Keywan Mortezaee. 2019. “Extracellular-signal-regulated Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase Signaling as a Target for Cancer Therapy: An Updated Review.” *Cell Biology International* 43 (11): 1206–22. <https://doi.org/10.1002/cbin.11187>.
118. Neel, Dana S., and Trevor G. Bivona. 2017. “Resistance Is Futile: Overcoming Resistance to Targeted Therapies in Lung Adenocarcinoma.” *Npj Precision Oncology* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0007-0>.

119. Nimmakayala, Rama Krishna, Surinder K. Batra, and Moorthy P. Ponnusamy. 2019. "Unraveling the Journey of Cancer Stem Cells from Origin to Metastasis." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.10.006>.
120. Nitta, Ryan T., Shawn S. Badal, and Albert J. Wong. 2010. "Measuring the Constitutive Activation of C-Jun N-Terminal Kinase Isoforms." In *Methods in Enzymology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381298-8.00026-5>.
121. NITULESCU, GEORGE MIHAI, DENISA MARGINA, PETRAS JUZENAS, QIAN PENG, OCTAVIAN TUDOREL OLARU, EMMANOUIL SALOUSTROS, CONCETTINA FENGA, DEMETRIOS A. SPANDIDOS, MASSIMO LIBRA, and ARISTIDIS M. TSATSAKIS. 2016. "Akt Inhibitors in Cancer Treatment: The Long Journey from Drug Discovery to Clinical Use (Review)." *International Journal of Oncology* 48 (3): 869–85. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3306>.
122. Niu, Nifang, and Liewei Wang. 2015. "In Vitro Human Cell Line Models to Predict Clinical Response to Anticancer Drugs." *Pharmacogenomics*. <https://doi.org/10.2217/pgs.14.170>.
123. Ojima, Iwao, Brendan Lichtenthal, Siyeon Lee, Changwei Wang, and Xin Wang. 2016. "Taxane Anticancer Agents: A Patent Perspective." *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. <https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1111872>.
124. Panda, Munmun, and Bijesh K. Biswal. 2019. "Cell Signaling and Cancer: A Mechanistic Insight into Drug Resistance." *Molecular Biology Reports* 46 (5): 5645–59. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04958-6>.
125. Paoli, Paolo, Elisa Giannoni, and Paola Chiarugi. 2013. "Anoikis Molecular Pathways and Its Role in Cancer Progression." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (12): 3481–98. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026>.
126. Patterson, Kate I., Tilman Brummer, Philippa M. O'brien, and Roger J. Daly. 2009. "Dual-Specificity Phosphatases: Critical Regulators with Diverse Cellular Targets." *Biochemical Journal* 418 (3): 475–89. <https://doi.org/10.1042/BJ20082234>.
127. Petak, Istvan, Janet Houghton, and Laszlo Kopper. 2008. "Molecular Targeting of Cell Death Signal Transduction Pathways in Cancer." *Current Signal Transduction Therapy*. <https://doi.org/10.2174/157436206775269217>.
128. Pons-Tostivint, Elvire, Benoît Thibault, and Julie Guillermet-Guibert. 2017. "Targeting PI3K Signaling in Combination Cancer Therapy." *Trends in Cancer* 3 (6): 454–69. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.002>.
129. Puneekar, Salman R., Vamsidhar Velcheti, Benjamin G. Neel, and Kwok-Kin Wong. 2022. "The Current State of the Art and Future Trends

- in RAS-Targeted Cancer Therapies.” *Nature Reviews Clinical Oncology*, August, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00671-9>.
130. Ramesh, Rajagopal. 2010a. “Drug Resistance in Lung Cancer.” *Lung Cancer: Targets and Therapy* 1 (May): 23. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S6861>.
 131. Ravi, Maddaly, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. Paul Solomon. 2015. “3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications.” *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
 132. Reisfeld, Smadar, and Lily Vardimon. 1994. “Cell to Cell Contacts Control the Transcription Activity of the Glucocorticoid Receptor.” *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/mend.8.9.7838155>.
 133. Renshaw, Jane, Kathryn R. Taylor, Ryan Bishop, Melanie Valenti, Alexis De Haven Brandon, Sharon Gowan, Suzanne A. Eccles, et al. 2013. “Dual Blockade of the PI3K/AKT/MTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) Pathways Synergistically Inhibits Rhabdomyosarcoma Cell Growth In Vitro and In Vivo.” *Clinical Cancer Research* 19 (21): 5940–51. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0850>.
 134. Roberts, Richard. 2012. “The Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Pathway: A Potential Therapeutic Target in Hypertension.” *Journal of Experimental Pharmacology*, August, 77. <https://doi.org/10.2147/JEP.S28907>.
 135. Robey, Thomas E., Mark K. Saiget, Hans Reinecke, and Charles E. Murry. 2008. “Systems Approaches to Preventing Transplanted Cell Death in Cardiac Repair.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45 (4): 567–81. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.03.009>.
 136. Rodova, Marianna, Renuka Jayini, Reddy Singasani, Elizabeth Chipps, and M. Rafiq Islam. 2013. “CMV Promoter Is Repressed by P53 and Activated by JNK Pathway.” *Plasmid*. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.01.004>.
 137. Rosen, Kirill, Wen Shi, Bruno Calabretta, and Jorge Filmus. 2002. “Cell Detachment Triggers P38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Overexpression of Fas Ligand: A Novel Mechanism of Anoikis of Intestinal Epithelial Cells.” *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207883200>.
 138. Roskoski, Robert. 2019a. “Targeting ERK1/2 Protein-Serine/Threonine Kinases in Human Cancers.” *Pharmacological Research* 142 (February): 151–68. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.01.039>.
 139. Rottenberg, Sven, Carmen Disler, and Paola Perego. 2021. “The Rediscovery of Platinum-Based Cancer Therapy.” *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00308-y>.
 140. Ruiz-Ceja, Karla A., and Yolanda I. Chirino. 2017. “Current FDA-Approved Treatments for Non-Small Cell Lung Cancer and Potential

- Biomarkers for Its Detection.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90 (June): 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.03.018>.
141. Ryoo, Hyung Don, and Andreas Bergmann. 2012. “The Role of Apoptosis-Induced Proliferation for Regeneration and Cancer.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008797>.
 142. Saini, Heena, Rakshita Dave, Subhashree Chatterjee, Ayushi Mandloi, Harshita Sharma, Ankita Daiya, Sudeshna Mukherjee, Rajdeep Chowdhury, and Shibasish Chowdhury. 2023. “Transcriptomic Analysis Reveals Differential Adaptation of Colorectal Cancer Cells to Low and Acute Doses of Cisplatin.” *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147304>.
 143. Saini, Kamal S., Sherene Loi, Evandro de Azambuja, Otto Metzger-Filho, Monika Lamba Saini, Michail Ignatiadis, Janet E. Dancey, and Martine J. Piccart-Gebhart. 2013. “Targeting the PI3K/AKT/MTOR and Raf/MEK/ERK Pathways in the Treatment of Breast Cancer.” *Cancer Treatment Reviews* 39 (8): 935–46. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.03.009>.
 144. Saranya, Jayaram, Ganesan Shilpa, Kozhiparambil G. Raghu, and Sulochana Priya. 2017. “Morus Alba Leaf Lectin (MLL) Sensitizes MCF-7 Cells to Anoikis by Inhibiting Fibronectin Mediated Integrin-FAK Signaling through Ras and Activation of P38 MAPK.” *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00034>.
 145. Sasaki, Takamitsu, Yuichi Yamashita, and Hiroki Kuniyasu. 2015. “AKT Plays a Crucial Role in Gastric Cancer (Review).” *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3260>.
 146. Sato, Hiroki, Hiromasa Yamamoto, Masakiyo Sakaguchi, Kazuhiko Shien, Shuta Tomida, Tadahiko Shien, Hirokuni Ikeda, et al. 2018. “Combined Inhibition of MEK and PI3K Pathways Overcomes Acquired Resistance to EGFR-TKIs in Non-Small Cell Lung Cancer.” *Cancer Science* 109 (10): 3183–96. <https://doi.org/10.1111/cas.13763>.
 147. Schlenk, Richard F, and Sabine Kayser. 2018. *Small Molecules in Hematology*. Edited by Uwe M. Martens. Vol. 212. Recent Results in Cancer Research. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-91439-8>.
 148. Shariati, M, Investigational Cancer Therapeutics, and Personalized Cancer Therapy. 2019. *Predictive Biomarkers in Oncology*. Edited by Sunil Badve and George Louis Kumar. *Predictive Biomarkers in Oncology*. Vol. 2. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95228-4>.
 149. Shariati, Maryam, and Funda Meric-Bernstam. 2019a. “Targeting AKT for Cancer Therapy.” *Expert Opinion on Investigational Drugs* 28 (11): 977–88. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1676726>.
 150. Sheppard, Karen E., Carleen Cullinane, Katherine M. Hannan, Meaghan Wall, Joanna Chan, Frances Barber, Jung Foo, et al. 2013. “Synergistic

- Inhibition of Ovarian Cancer Cell Growth by Combining Selective PI3K/MTOR and RAS/ERK Pathway Inhibitors.” *European Journal of Cancer* 49 (18): 3936–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.08.007>.
151. Shriman, Snjbs, and Sureshdada Jain. 2019. “EGFR : AN IMPORTANT PERSPECTIVE IN CANCER THERAPY” 5 (134): 134–49. <https://doi.org/10.26479/2019.0502.11>.
 152. Smorodinsky-Atias, Karina, Nadine Soudah, and David Engelberg. 2020. “Mutations That Confer Drug-Resistance, Oncogenicity and Intrinsic Activity on the ERK MAP Kinases—Current State of the Art.” *Cells* 9 (1): 129. <https://doi.org/10.3390/cells9010129>.
 153. Soares-Silva, Mercedes, Flavia F. Diniz, Gabriela N. Gomes, and Diana Bahia. 2016. “The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway: Role in Immune Evasion by Trypanosomatids.” *Frontiers in Microbiology* 7 (FEB): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00183>.
 154. Song, Mengqiu, Ann M. Bode, Zigang Dong, and Mee-Hyun Lee. 2019a. “AKT as a Therapeutic Target for Cancer.” *Cancer Research* 79 (6): 1019–31. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2738>.
 155. Song, Wenqiang, Yufang Ma, Jialiang Wang, Dana Brantley-Sieders, and Jin Chen. 2014. “JNK Signaling Mediates Eph2-Dependent Tumor Cell Proliferation, Motility, and Cancer Stem Cell-Like Properties in Non-Small Cell Lung Cancer.” *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2136>.
 156. Sonnenschein, Carlos, and Ana M. Soto. 2011. “The Death of the Cancer Cell.” *Cancer Research* 71 (13): 4334–37. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0639>.
 157. Spangler, B., L. Vardimon, A. K. Bosserhoff, and S. Kuphal. 2011. “Post-Transcriptional Regulation Controlled by E-Cadherin Is Important for c-Jun Activity in Melanoma.” *Pigment Cell and Melanoma Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00787.x>.
 158. Spangler, Barbara, Melanie Kappelmann, Birgit Schitteck, Svenja Meierjohann, Lily Vardimon, Anja Katrin Bosserhoff, and Silke Kuphal. 2012. “ETS-1/RhoC Signaling Regulates the Transcription Factor c-Jun in Melanoma.” *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.26277>.
 159. Steelman, Linda S., William H. Chappell, Stephen L. Abrams, C. Ruth Kempf, Jacquelyn Long, Piotr Laidler, Sanja Mijatovic, et al. 2011. “Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/MTOR Pathways in Controlling Growth and Sensitivity to Therapy-Implications for Cancer and Aging.” *Aging* 3 (3): 192–222. <https://doi.org/10.18632/aging.100296>.
 160. Stinchcombe, Thomas E., and Gary L. Johnson. 2014. “MEK Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer.” *Lung Cancer* 86 (2): 121–25. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.09.005>.

161. Stulpinas, Aurimas, Daiva Bironaitė, and Audronė V. Kalvelytė. 2008. "MAPK Signalling in Skeletal Muscle-Derived Stem Cells after Daunorubicin Treatment." *Biologija*. <https://doi.org/10.2478/v10054-008-0045-1>.
162. Stulpinas, Aurimas, Aušra Imbrasaitė, Natalija Krestnikova, and Audronė Valerija Kalvelytė. 2020. "Recent Approaches Encompassing the Phenotypic Cell Heterogeneity for Anticancer Drug Efficacy Evaluation." In *Tumor Progression and Metastasis*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89395>.
163. Stulpinas, Aurimas, and Audronė Valerija Kalvelytė. 2019. "Cell Death and Its Different Modes: History of Understanding and Current Trends." *International Journal of Biochemistry Research & Review*. <https://doi.org/10.9734/ijbcrr/2019/v26i130089>.
164. Stulpinas, Aurimas, Tomas Uzusienis, Ausra Imbrasaite, Natalija Krestnikova, Ausra Unguryte, and Audrone V. Kalvelyte. 2021. "Cell-Cell and Cell-Substratum Contacts in the Regulation of MAPK and Akt Signalling: Importance in Therapy, Biopharmacy and Bioproduction." *Cellular Signalling* 84 (August): 110034. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034>.
165. Sun, Duxin, Wei Gao, Hongxiang Hu, and Simon Zhou. 2022. "Why 90% of Clinical Drug Development Fails and How to Improve It?" *Acta Pharmaceutica Sinica B* 12 (7): 3049–62. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002>.
166. Sun, Zhenguo, Zhou Wang, Xiangyan Liu, and Dong Wang. 2015. "New Development of Inhibitors Targeting the PI3K/AKT/MTOR Pathway in Personalized Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer." *Anti-Cancer Drugs*. <https://doi.org/10.1097/CAD.000000000000172>.
167. Swayden, Mirna, Juan Iovanna, and Philippe Soubeyran. 2018. "Pancreatic Cancer Chemo-Resistance Is Driven by Tumor Phenotype Rather than Tumor Genotype." *Heliyon*. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01055>.
168. Szturz, Petr, Kristien Wouters, Naomi Kiyota, Makoto Tahara, Kumar Prabhash, Vanita Noronha, David Adelstein, Dirk Van Gestel, and Jan B. Vermorken. 2019. "Low-Dose vs. High-Dose Cisplatin: Lessons Learned from 59 Chemoradiotherapy Trials in Head and Neck Cancer." *Frontiers in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00086>.
169. Tai, Yu Ling, Lih Chyang Chen, and Tang Long Shen. 2015. "Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer." *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/690690>.
170. Tan, Aaron C. 2020. "Targeting the PI3K/Akt/MTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Thoracic Cancer*. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13328>.
171. Temraz, Sally, Deborah Mukherji, and Ali Shamseddine. 2015. "Dual Inhibition of MEK and PI3K Pathway in KRAS and BRAF Mutated

- Colorectal Cancers.” *International Journal of Molecular Sciences* 16 (9): 22976–88. <https://doi.org/10.3390/ijms160922976>.
172. Thangavel, Hariprasad, Carmine De Angelis, Suhas Vasaikar, Raksha Bhat, Mohit Kumar Jolly, Chandandeep Nagi, Chad J. Creighton, et al. 2019. “A CTC-Cluster-Specific Signature Derived from OMICS Analysis of Patient-Derived Xenograft Tumors Predicts Outcomes in Basal-Like Breast Cancer.” *Journal of Clinical Medicine*. <https://doi.org/10.3390/jcm8111772>.
173. Thotakura, Nagarani, Gajanand Sharma, Bhupinder Singh, Vipin Kumar, and Kaisar Raza. 2018. “Aspartic Acid Derivatized Hydroxylated Fullerenes as Drug Delivery Vehicles for Docetaxel: An Explorative Study.” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 46 (8): 1763–72. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1392314>.
174. Tolcher, Anthony W., Wei Peng, and Emiliano Calvo. 2018. “Rational Approaches for Combination Therapy Strategies Targeting the MAP Kinase Pathway in Solid Tumors.” *Molecular Cancer Therapeutics* 17 (1): 3–16. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0349>.
175. Tomás-Bort, Elena, Markus Kieler, Shreya Sharma, Juliana B. Candido, and Daniela Loessner. 2020. “3D Approaches to Model the Tumor Microenvironment of Pancreatic Cancer.” *Theranostics*. <https://doi.org/10.7150/thno.42441>.
176. Tsai, Pei-Jane, Yi-Hsin Lai, Rajesh Kumar Manne, Yau-Sheng Tsai, Dos Sarbassov, and Hui-Kuan Lin. 2022. “Akt: A Key Transducer in Cancer.” *Journal of Biomedical Science* 29 (1): 76. <https://doi.org/10.1186/S12929-022-00860-9>.
177. Turke, Alexa B., Youngchul Song, Carlotta Costa, Rebecca Cook, Carlos L. Arteaga, John M. Asara, and Jeffrey A. Engelman. 2012. “MEK Inhibition Leads to PI3K/AKT Activation by Relieving a Negative Feedback on ERBB Receptors.” *Cancer Research* 72 (13): 3228–37. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3747>.
178. Vachon, Pierre H. 2011. “Integrin Signaling, Cell Survival, and Anoikis: Distinctions, Differences, and Differentiation.” *Journal of Signal Transduction* 2011 (July): 1–18. <https://doi.org/10.1155/2011/738137>.
179. Vachon, Pierre H., Charlène Harnois, Amélie Grenier, Geneviève Dufour, Véronique Bouchard, Jiahuai Han, Jacques Landry, et al. 2002. “Differentiation State-Selective Roles of P38 Isoforms in Human Intestinal Epithelial Cell Anoikis.” *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37072>.
180. Vasan, Neil, and Lewis C. Cantley. 2022. “At a Crossroads: How to Translate the Roles of PI3K in Oncogenic and Metabolic Signalling into Improvements in Cancer Therapy.” *Nature Reviews Clinical Oncology* 19 (7): 471–85. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00633-1>.
181. Vitillo, Lorian, Melissa Baxter, Banu Iskender, Paul Whiting, and Susan J. Kimber. 2016. “Integrin-Associated Focal Adhesion Kinase Protects Human Embryonic Stem Cells from Apoptosis, Detachment,

- and Differentiation.” *Stem Cell Reports*.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.006>.
182. Wada, Teiji, and Josef M. Penninger. 2004. “Mitogen-Activated Protein Kinases in Apoptosis Regulation.” *Oncogene* 23 (16): 2838–49.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207556>.
 183. Wagner, Erwin F., and Ángel R. Nebreda. 2009. “Signal Integration by JNK and P38 MAPK Pathways in Cancer Development.” *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc2694>.
 184. Waldmeier, Peter C. 2007. “An Assessment of the Chances of Antiapoptotic Drug Therapy in Patients with Neurodegenerative Disorders.” In *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. <https://doi.org/10.1016/B978-044452809-4/50162-9>.
 185. Walsh, Mary F., Vijayalakshmi Thamilselvan, Rainer Grotelueschen, Lulu Farhana, and Marc D. Basson. 2003. “Absence of Adhesion Triggers Differential FAK and SAPKp38 Signals in SW620 Human Colon Cancer Cells That May Inhibit Adhesiveness and Lead to Cell Death.” *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000071864>.
 186. Ward, Kristy K., Isabelle Tancioni, Christine Lawson, Nichol L.G. Miller, Christine Jean, Xiao Lei Chen, Sean Uryu, et al. 2013. “Inhibition of Focal Adhesion Kinase (FAK) Activity Prevents Anchorage-Independent Ovarian Carcinoma Cell Growth and Tumor Progression.” *Clinical and Experimental Metastasis*. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9562-5>.
 187. Weart, Thomas C., Kenneth D. Miller, and Charles B Simone II. 2018. “Spotlight on Dabrafenib/Trametinib in the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer: Place in Therapy.” *Cancer Management and Research* Volume 10 (April): 647–52.
<https://doi.org/10.2147/CMAR.S142269>.
 188. Weston, Claire R., and Roger J. Davis. 2007. “The JNK Signal Transduction Pathway.” *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.001>.
 189. Wilschut, Karlijn J., Henk P. Haagsman, and Bernard A.J. Roelen. 2010. “Extracellular Matrix Components Direct Porcine Muscle Stem Cell Behavior.” *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.10.014>.
 190. Wright, Cameron J. M., and Paul L. McCormack. 2013. “Trametinib: First Global Approval.” *Drugs* 73 (11): 1245–54.
<https://doi.org/10.1007/s40265-013-0096-1>.
 191. Wu, Hui-Mei, Li-Jie Shao, Zi-Feng Jiang, and Rong-Yu Liu. 2016. “Gemcitabine-Induced Autophagy Protects Human Lung Cancer Cells from Apoptotic Death.” *Lung* 194 (6): 959–66.
<https://doi.org/10.1007/s00408-016-9936-6>.
 192. Wu, Qinghua, Wenda Wu, Bishi Fu, Lei Shi, Xu Wang, and Kamil Kuca. 2019. “JNK Signaling in Cancer Cell Survival.” *Medicinal*

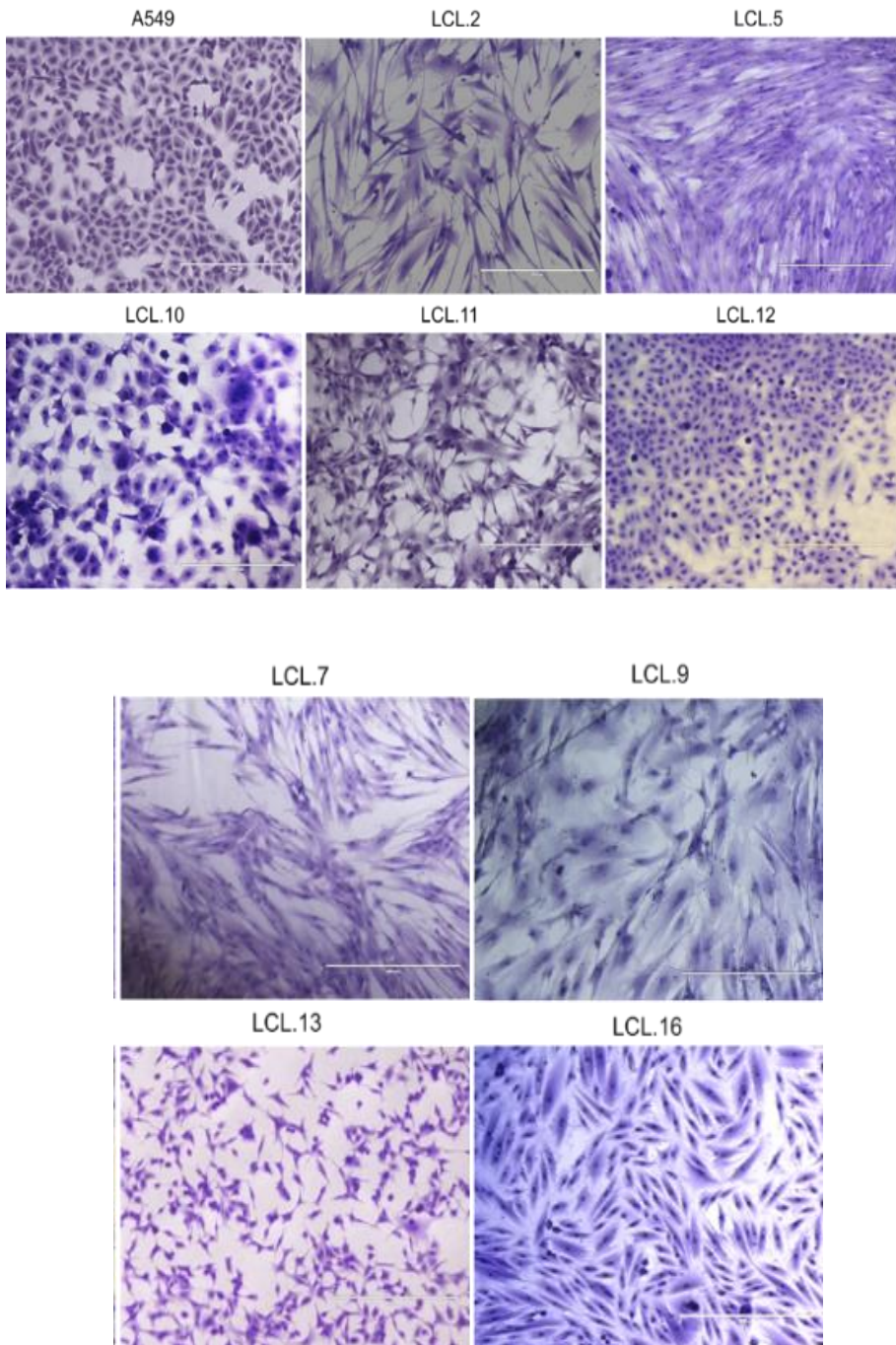
193. Wu, Qinghua, Wenda Wu, Vesna Jacevic, Tanos C. C. Franca, Xu Wang, and Kamil Kuca. 2020. “Selective Inhibitors for JNK Signalling: A Potential Targeted Therapy in Cancer.” *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35 (1): 574–83.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1720013>.
194. Yaeger, Rona, and Ryan B. Corcoran. 2019. “Targeting Alterations in the RAF–MEK Pathway.” *Cancer Discovery*.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1321>.
195. Yang, Jing, Ji Nie, Xuelei Ma, Yuquan Wei, Yong Peng, and Xiawei Wei. 2019. “Targeting PI3K in Cancer: Mechanisms and Advances in Clinical Trials.” *Molecular Cancer* 18 (1): 26.
<https://doi.org/10.1186/s12943-019-0954-x>.
196. Yokota, Tomohiro, and Yibin Wang. 2016. “P38 MAP Kinases in the Heart.” *Gene* 575 (2): 369–76.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.030>.
197. Yuen, Hiu-Fung Fung, Olga Abramczyk, Grant Montgomery, Kwok-Wah Ka-Kui Kui Kwok Wah Chan, Yu-Han Han Huang, Takehiko Sasazuki, Senji Shirasawa, et al. 2012. “Impact of Oncogenic Driver Mutations on Feedback between the PI3K and MEK Pathways in Cancer Cells.” *Bioscience Reports* 32 (4): 413–22.
<https://doi.org/10.1042/BSR20120050>.
198. Zhang, Hao, Huanjie Shao, Vita M. Golubovskaya, Hongbin Chen, William Cance, Alex A. Adjei, and Grace K. Dy. 2016. “Efficacy of Focal Adhesion Kinase Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer with Oncogenically Activated MAPK Pathways.” *British Journal of Cancer* 115 (2): 203–11. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.190>.
199. Zhang, Lingzhi, Qirong Ju, Jinjin Sun, Lei Huang, Shiqi Wu, Shuping Wang, Yin Li, Zhe Guan, Qihua Zhu, and Yungen Xu. 2020. “Discovery of Novel Dual Extracellular Regulated Protein Kinases (ERK) and Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) Inhibitors as a Promising Strategy for Cancer Therapy.” *Molecules* 25 (23): 5693.
<https://doi.org/10.3390/molecules25235693>.
200. Zhang, Yiqun, Patrick Kwok-Shing Ng, Melanie Kucherlapati, Fengju Chen, Yuexin Liu, Yiu Huen Tsang, Guillermo de Velasco, et al. 2017. “A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/MTOR Pathway Alterations.” *Cancer Cell* 31 (6): 820-832.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.04.013>.
201. ZHANG, YUNCHENG, YUANWEN ZHENG, ALI FAHEEM, TIANTONG SUN, CHUNYOU LI, ZHE LI, DIANTANG ZHAO, CHAO WU, and JUN LIU. 2016. “A Novel AKT Inhibitor, AZD5363, Inhibits Phosphorylation of AKT Downstream Molecules, and Activates Phosphorylation of MTOR and SMG-1 Dependent on the Liver Cancer

- Cell Type.” *Oncology Letters* 11 (3): 1685–92. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4111>.
202. Zhong, Lei, Yueshan Li, Liang Xiong, Wenjing Wang, Ming Wu, Ting Yuan, Wei Yang, et al. 2021. “Small Molecules in Targeted Cancer Therapy: Advances, Challenges, and Future Perspectives.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (1): 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>.
203. Zhong, Xiaoling, and Frederick J. Rescorla. 2012. “Cell Surface Adhesion Molecules and Adhesion-Initiated Signaling: Understanding of Anoikis Resistance Mechanisms and Therapeutic Opportunities.” *Cellular Signalling* 24 (2): 393–401. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.10.005>.
204. Zimmermann, Sven, and Karin Moelling. 1999. “Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B).” *Science* 286 (5445): 1741–44. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1741>.

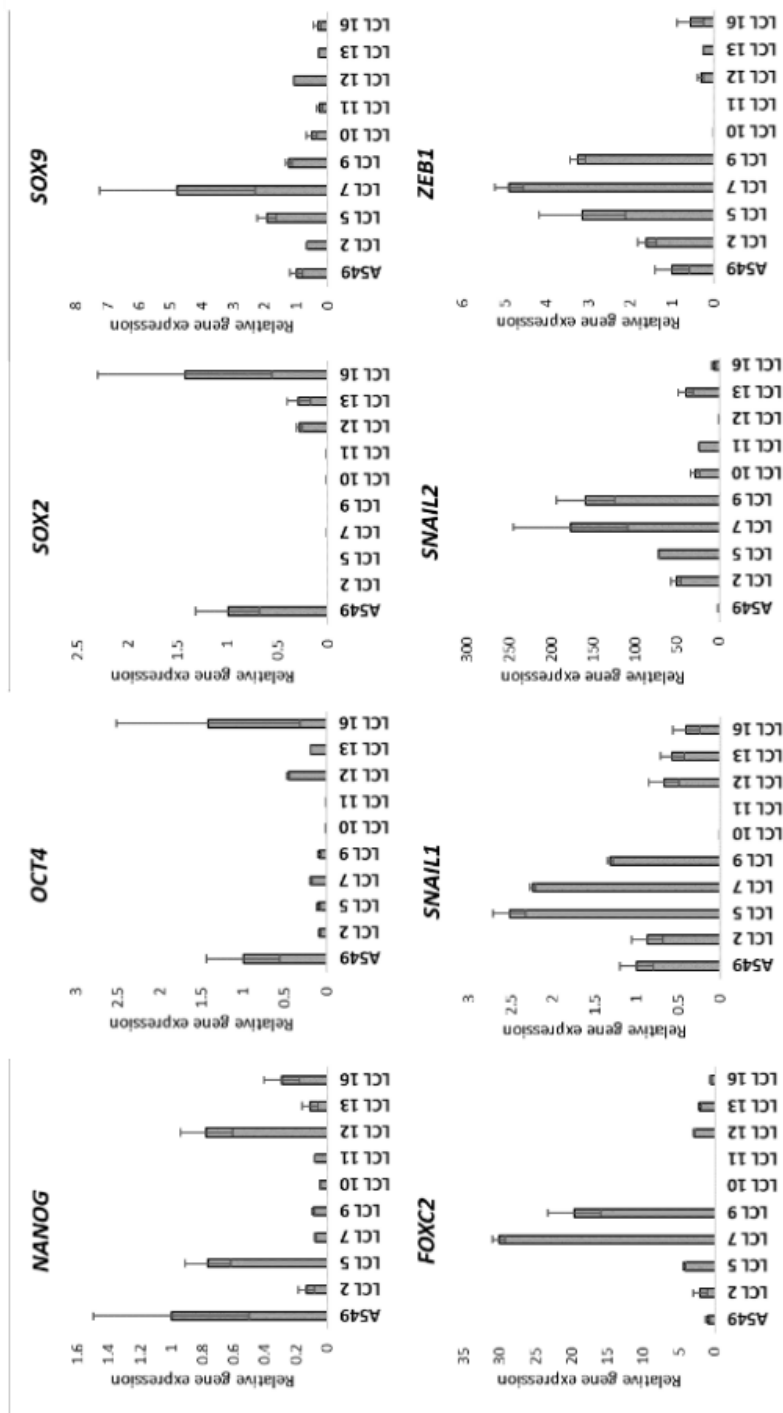
PRIEDAI

%	CD24	CD44	CD54	CD56	CD90	CD117	CD133	CD166	CD324	CD325	CD326	HER3
A549	80.1	91	50.3	13	14.1	17.1	28.5	95.6	51.2	40.1	29.5	8.2
LCL2	2.6	93.7	64.2	5.6	91.3	9.8	13.8	62.6	1.8	31.8	0	0
LCL5	1	91.7	68.8	5.9	94.6	7.7	46.8	67.2	0	39.6	0	0
LCL7	0	92.9	72.5	8.1	90.9	-	21.2	72.6	0	51.8	0	0
LCL9	0	45.6	39.7	6.4	83.9	7.1	16.3	69.1	1.5	21.1	0	0
LCL10	4.1	1.8	52.1	40.2	49.5	23.1	67.5	3.5	3.8	94.7	0.8	0
LCL11	4	2.9	36.1	41.6	66.6	64.7	91.5	0	0	96.4	0	0
LCL12	96.8	94.6	31.1	16.7	1.7	27	41	97.4	95	47.6	44.5	69.4
LCL13	89.2	88	7.6	4.3	0	1.3	-	96.7	70.2	30	0.9	-
MFI	CD24	CD44	CD54	CD56	CD90	CD117	CD133	CD166	CD324	CD325	CD326	HER3
A549	1683	991	62	8	10	9	12	5463	832	24	36	29
LCL2	3	296	267	10	841	16	15	174	3	55	1	1
LCL5	13	2093	412	26	10,083	31	157	329	1	133	1	1
LCL7	1	2288	351	15	1906	-	41	438	1	137	1	1
LCL9	1	178	34	5	50,793	4	7	2352	11	7	1	1
LCL10	14	5	58	43	123	23	83	16	14	299	1	1
LCL11	42	25	132	147	401	216	443	0	26	851	15	1
LCL12	8630	1903	27	17	5	25	39	6070	826	57	49	224
LCL13	2678	3173	11	15	1	7	-	1289	272	102	2	-

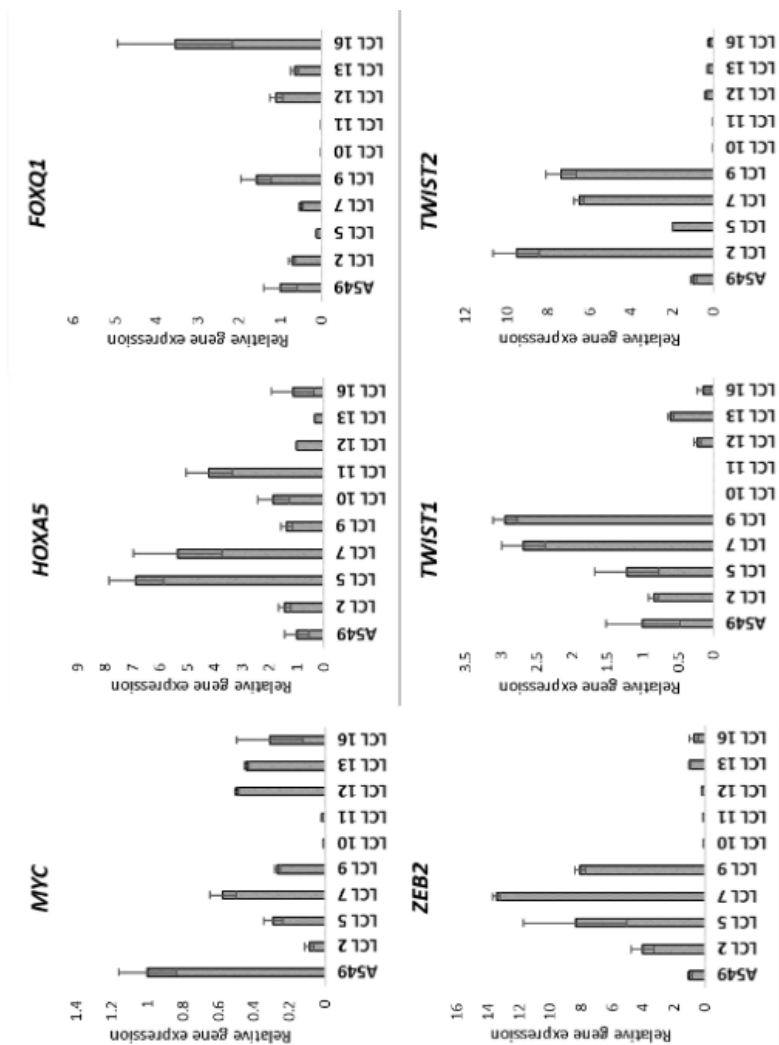
R1 lentelė. Nesmulkialąstelinio plaučių vėžio ląstelių linijų charakterizavimas tėkmės citometrijos metodu. Viršuje – procentinė teigiamų pagal konkrečių žymenį ląstelių išraiška populiacijoje; apačioje – vidutinė signalo vertė (median fluorescence intensity, MFI) tiriamoje ląstelių linijoje



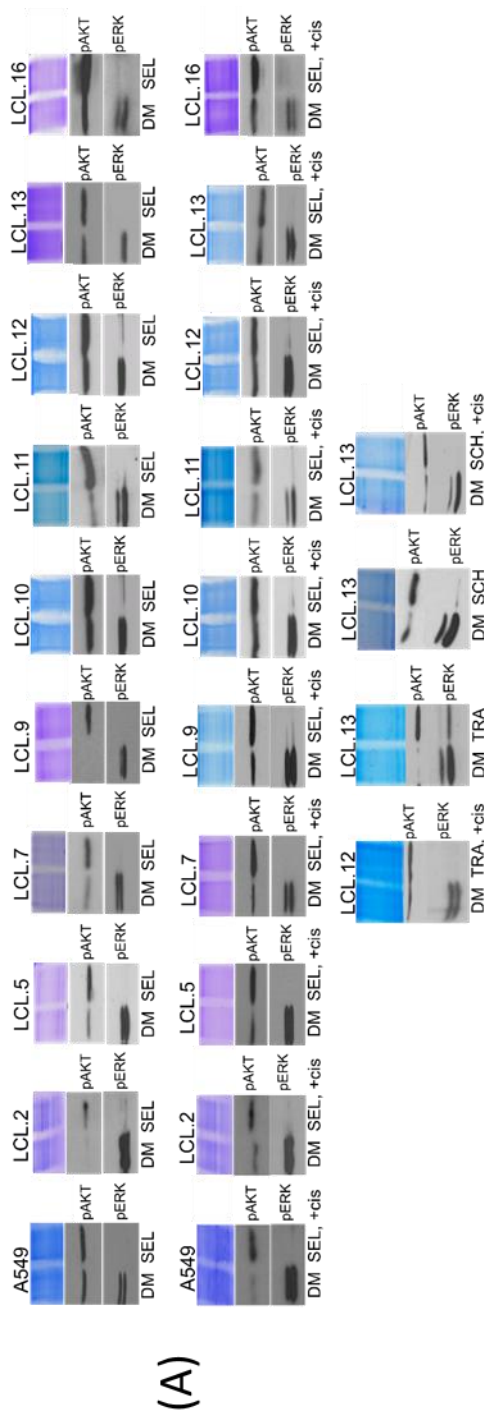
T1 pav. Žmogaus plaučių NSCLC navikinės kilmės ląstelių linijų apibūdinimas. (A) A549 ląstelių ir pirminių ląstelių linijų, augintų in vitro daugiau kaip 10 persėjimų, morfologija. Mastelio juosta – 400 μm . Ląstelės nudažytos kristalinio violeto dažais.



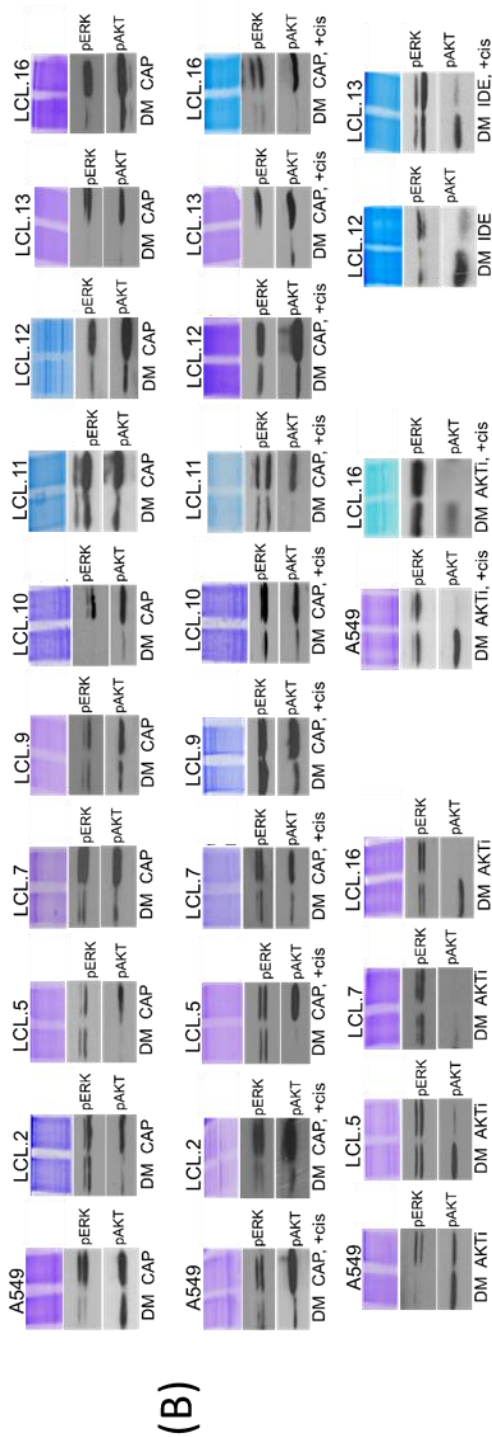
T1 pav. (tęsinys kitame puslapyje)



T1 pav. (tęsinys). Žmogaus plaučių NSCLC navikinės kilmės ląstelių linijų apibūdinimas. (B) Santykinė kamieninių ląstelių ir su EMT susijusių transkripcijos veiksnių raiška, nustatyta RT-qPCR metodu (lyginant su GAPDH). Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm SD ($N = 2$).



T7 pav. ERK ir AKT signalų kryžminė sąveika plaučių vėži įstelių linijose. (A) ERK/MEK inhibitoriai selumetinibas, trametinibas, taip pat ERK slopiklis SCH772984 padidina AKT fosforilinimą visose ištytose įstelių linijose, kai nėra cisplatinos arba, ją pridėjus



T7 pav. ERK ir AKT signalų kryžminė sąveika plaučių vėžį ląstelių linijose. (B) AKT slopikliai kapivasertibas, AKT inhibitorius VIII, PI3K slopiklis idelalisibas sustiprina ERK1/2 fosforilinimą visose ištyrtose ląstelių linijose, kontrolinėse arba cisplatina paveiktose ląstelėse. Pateikti tipiniai Western blot paveikslai. Coomassie dažyti baltymų geliai pateikiami kaip kiekio kontrolė. Buvo naudojamas 6 valandas trunkantis vaistų poveikis. Cisplatinos koncentracija 90 μM . Kinazių slopiklių koncentracija buvo 10 μM , išskyrus trametinibą ir SCH72984 (1 μM). DM – tirpiklio kontrolė (DMSO), SEL – selumetinibas, +cis – cisplatina, TRA – trametinibas, SCH – ERK inhibitorius SCH72984, CAP – kapivasertibas, AKTi – AKT inhibitorius VIII, IDE – idelalisibas

DISERTANTO GYVENIMO, MOKSLINĖS IR KŪRYBINĖS VEIKLOS APRAŠYMAS

Vardas, pavardė <i>Aurimas Stulpinas</i>	Pareigos: Jaunesnysis mokslo darbuotojas
	Adresas: Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biochemijos institutas Saulėtekio al. 7, V203. LT-10257 Vilnius, Lietuva Telefonas: +370 5 2234407 El. Paštas: aurimas.stulpinas@bchi.vu.lt

Išsilavinimas

Institucija	Laipsnis	Metai	Mokslų sritis
Vilniaus Universitetas, Lietuva	bakalauro	2001	biochemija
Vilniaus Universitetas, Lietuva	magistro	2003	biochemija

Gimė 1979 liepos 12 d., Vilniuje. 1997 metais baigė Vilniaus tikslųjų gamtos ir technikos mokslų licėjų. 1997 metais tarptautinėje moksleivių chemijos olimpiadoje Montrealyje (Kanada) Lietuvai iškovojo bronzos medalį. 2007 metais susituokė, turi šešis vaikus (Bazilė ir Dorotėja gimė doktorantūros studijų laikotarpiu).

Mokslinė ir/arba profesinė patirtis

Profesinė patirtis:

2016 – iki šiol	Vilniaus universitetas Gyvybės mokslų centras	jaunesnysis mokslo darbuotojas
2010 – 2016	Vilniaus universitetas Biochemijos institutas	jaunesnysis mokslo darbuotojas
2004 – 2010	Biochemijos institutas	jaunesnysis mokslo darbuotojas
2004	VU Onkologijos institutas	laborantas
1999 – 2004	Biochemijos institutas	laborantas

Mokslinių interesų sritis:

Apoptozės reguliacija, signalo perdavimo keliai, vėžinių ir kamieninių ląstelių kultūros ir linijos, taikinių terapija, toksiškumo molekuliniai mechanizmai, regeneracinė medicina.

Kvalifikaciniai pažymėjimai, narystė:

- Lietuvos Biochemikų draugijos narys
- Lietuvos kamieninių ląstelių tyrėjų asociacijos narys
- Asociacijos „Soci t  de Chimie Th rapeutique – SCT“ narys
- „Mokslininkų kvalifikacijos gerinimas medžiagotyros, biotechnologijos ir aplinkotyros srityse“ projektų dalyvis (2006-2007 m.)

Dalyvavimas Mokslo programose ir projektuose

- LVMSF inicijuota programa „Kamieninių ląstelių integracija, jų išgyvenimas ir funkcinis pajėgumas patologiniame židinyje. Iki klinikiniai tyrimai“, Biochemijos instituto temos (Kamieninių (miogeninių) ląstelių išgyvenimo ir žūties patologiniame židinyje signalinių kelių nustatymas ir stresui atsparių genetiškai modifikuotų ląstelių kūrimas), **vykdytojas**. Reg. Nr. U-04001. Projekto trukmė: 2004 -2006 m.
- LVMSF Aukštųjų technologijų plėtros projektas „Širdies struktūrų regeneracijos modelių kūrimas, naudojant kamienines ir specializuotas ląsteles bei biologinius audinius“, **vykdytojas**. Nr. B-07041. Projekto trukmė: 2007-2009 m.
- LVMSF Prioritetinių Lietuvos mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros kryptių (Genomika ir biotechnologijos sveikatai ir žemės ūkiui) mokslo programos projektas „Fundamentiniai kamieninių ląstelių funkcionavimo mechanizmų tyrimai. Citoterapija 2.“ Biochemijos instituto projekto dalies (Suaugusio organizmo skirtingos diferenciacijos kamieninių ląstelių žūties ir išgyvenimo reguliavimo signalinių mechanizmų tyrimas), **vykdytojas**. Nr. C-07023. Projekto trukmė: 2007-2009 m.
- LMT Nacionalinės mokslo programos projekto „Streso kinazės JNK, molekulinio taikinio terapijoje, veikimo prognostiniai žymenys“, **vykdytojas**. Nr. LIG-10034 (LIG-10/2010). Projekto trukmė: 2010 – 2011m.
- ES struktūrinės paramos priemonė „Parama mokslininkų ir kitų tyrėjų mokslinei veiklai (visuotinė dotacija“: „Molekuliniai chinonų ir polifenolių toksiškumo ir priešnavikinio aktyvumo mechanizmai:

- fermentinės redokso reakcijos, citotoksiškumas, signalo perdavimas ir proteomika“, vadovas N. Čėnas – **vykdytojas**. Nr. VP1-3.1-ŠMM-07-K-01-103. Projekto vertė 1586661 Lt (1,6 mln). Projekto trukmė: 2011-2015 m.
- Nacionalinis projektas: ES struktūrinės paramos priemonė „Mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros veiklų vykdymas pagal nacionalinių kompleksinių programų tematikas“: „Biotechnologija ir biofarmacija: fundamentiniai ir taikomieji tyrimai“, vadovas K. Sasnauskas. 2012-2015 m. Projekto vertė 4926352 Lt (4,9 mln.). Veikla/poveiklė: „Eukariotinių ląstelių molekuliniai vyksmai: technologiniai ir medicininiai aspektai“, **vykdytojas**. Projekto trukmė: 2012-2015 m.
 - 2014–2020 metų Europos Sąjungos fondų investicijų veiksmų programos 1 prioriteto „Mokslinių tyrimų, eksperimentinės plėtros ir inovacijų skatinimas“ 01.2.2-LMT-K-718 priemonės „Tiksliniai moksliniai tyrimai sumanios specializacijos srityje“ veiklos „Aukšto lygio tyrėjų grupių vykdomi moksliniai tyrimai“ finansuojamas Vilniaus universiteto įgyvendinamas projektas Nr. 01.2.2-LMT-K-718-01-0072 „Pacientui savitos plaučių vėžio heterogeninių ląstelių ex vivo modelinės sistemos sukūrimas priešvėžinių vaistų parinkimui personalizuotam gydymui“, **vykdytojas** ir **administratorius**. Projekto trukmė: 2017-2023 m., biudžetas 477.000 Eur.

Vadovavimas studentų baigiamiesiems darbams:

- Mariaus Lukoševičiaus bakalauro baigiamasis darbas „JNK signalinio kelio vaidmens tyrimas plaučių vėžio A549 linijos ląstelėse dauginimosi ir apoptozės metu“, Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedra, Biofizikos studijų programa, darbo vadovai: j.m.d. **Aurimas Stulpinas** ir dr. Audronė Valerija Kalvelytė, darbas apgintas 2009 metais.
- Andriaus Savicko bakalauro baigiamasis darbas „Streso aktyvinamos baltymų kinazės JNK vaidmuo vėžinių ląstelių apoptozėje“ VGTU Fundamentinių mokslų fakulteto Chemijos ir bioinžinerijos katedros bioinžinerijos studijų programa, vadovas **Aurimas Stulpinas**, darbas apgintas 2012 m.
- Mato Sereikos magistro baigiamasis darbas „Baltymų kinazių ERK ir AKT vaidmuo reguliuojant plaučių vėžio ląstelių žūtį po chemoterapinių medžiagų poveikio“, VU GMC Molekulinės biologijos studijų programa, vadovai Audronė V. Kalvelytė ir **Aurimas Stulpinas**, darbas apgintas 2020 m.

- Gabijos Anikevičiūtės bakalauro baigiamasis darbas „Baltymų tirozino kinazė Syk – taikiny s vėžio terapijoje?“, VU GMC Biomokslų instituto Genetikos specialybė, vadovas **Aurimas Stulpinas**, darbas apgintas 2021 m.
- Monikos Tenkutytės bakalauro baigiamasis darbas „JNK kaip galimas molekulinis taikiny s plaučių vėžio gydyme“, VU GMC molekulinės biologijos specialybė (2022-2023 m.)

Kita:

- Biochemijos instituto darbuotojai 2017-2020 m. **A. Stulpinas**, V. Borutinskaitė, G. Valiulienė, R. Meškys, M. Valius, I. Šakinytė, M. Jankunec, V. Bukelskienė, V. Gurevičienė skaitė paskaitas ir pravedė ekskursijas institute įvairių Lietuvos mokyklų (Vilniaus V. Sirokomlės, Nidos vidurinės mokyklos, Visagino Verdenės gimnazija, Klaipėdos Socialinių mokslų kolegija, Vilniaus Šv. Kristoforo gimnazijos) moksleiviams.
- **A. Stulpinas** vedė praktinius užsiėmimus bei skaitė paskaitas VGTU studentų mokslinės-gamybinės vasaros praktikos metu 2012-2016 m.

Tarptautinės konferencijos (2002 – 2022):

1. V. Bukelskienė, **A. Stulpinas**, A. Imbrasaitė, A. Jackevičius, A. Kalvelytė. „Primary cell lines from lung cancer in a study of apoptosis after chemotherapeutic treatments“. Third Baltic Congress of Oncology, 2-4 of May, 2002, Vilnius, Lithuania, Abstracts, p. 209
2. Bironaitė D. (pranešėja), V. Bukelskienė, D. Baltriukienė, J. Šmigelskaitė, A. Imbrasaitė, **A. Stulpinas**, A. Kalvelytė. „Search of possible targets of PI3K/Akt pro-apoptotic signaling in muscle-derived primary cell lines after cisplatin treatment“, P014. Biochemical Society 3rd focused meeting on PI3K signalling and disease, 6-8 of November, 2006, Bath Assembly Rooms, UK.
3. Kalvelytė A. (pranešėja), D. Bironaitė, D. Baltriukienė, **A. Stulpinas**, A. Imbrasaitė, V. Bukelskienė, N. Uralova, J. Šmigelskaitė. „Pro-apoptotic role of survival PI3K/AKT signaling pathway in muscle-derived stem cell lines“. Tarptautinė mokslinė konferencija „Šiuolaikinės Biochemijos iššūkiai ir galimybės“, 2007 m. lapkričio 15 d., Vilnius.
4. D. Baltriukienė, A.V. Kalvelytė, A. Pakevičienė, R. Jarašienė, D. Bironaitė, **A. Stulpinas**, A. Imbrasaitė, N. Uralova, V. Bukelskienė. „Myogenic Stem Cell Therapeutic Potential for Myocardium Repair“.

- Tarptautinė mokslinė konferencija “Šiuolaikinės Biochemijos iššūkiai ir galimybės”, 2007 m. lapkr. 15 d., Vilnius
5. D. Baltriukienė, V. Bukelskienė, **A. Stulpinas**, N. Uralova, D. Bironaitė, A. Imbrasaitė, A. Kalvelytė. „Role of JNK in muscle-derived stem cell proliferation and apoptosis”. International conference “Stem cells and cell therapy”, 2nd of November, 2007, Ryga (Latvia).
 6. Bironaitė D., D. Baltriukienė, N. Uralova, V. Bukelskienė, **A. Stulpinas**, A. Imbrasaitė, A. Kalvelytė. „Role of MAP Kinases in Nitric Oxide Induced Muscle-Derived Adult Stem Cell Apoptosis”. MOLEDA Summer School “Non-viral gene transfer into muscle and skin“. September 16-22, 2007 – Evry – Maison Alfort – Paris (France).
 7. Daiva Baltriukienė, Virginija Bukelskienė, **Aurimas Stulpinas**, Natalija Uralova, Daiva Bironaitė, Aušra Imbrasaitė, Audronė Kalvelytė. „JNK signaling pathway in cisplatin and doxorubicin induced myogenic cell apoptosis“. MOLEDA Summer School “Non-viral gene transfer into muscle and skin“. September, 16-22, 2007 – Evry – Maison Alfort – Paris (FRANCE).
 8. D. Baltriukiene, D. Bironaitė, **A. Stulpinas**, A. Imbrasaitė, V. Bukelskienė, A. Kalvelytė. „Mitogenų aktyvintų kinazių vaidmuo miogeninių ląstelių išgyvenimo/žūties reguliacijoje“. Lietuvos Biochemikų Draugijos X suvažiavimas-konferencija, birželis, 2008, Tolieja.
 9. V. Bukelskienė (pranešėja), A. Kalvelytė, D. Bironaitė, D. Baltriukienė, A. Imbrasaitė, **A. Stulpinas**, dokt. N. Krestnikova, R. Jarašienė, A. Packevičienė, J. Bukauskaitė. R. Širmenis, A. Kraniauskas. „Miogeninių kamieninių ląstelių išgyvenimo tyrimai modelinėse sistemose in vitro ir in vivo“. Konferencija „Ląstelinė terapija ir farmakologija: Iš mokslinės laboratorijos į kliniką“, 2010, Kaunas.
 10. Krestnikova, Natalija, Imbrasaitė, Aušra, **Stulpinas**, **Aurimas**, Bukelskienė, Virginija, Baltriukienė, Daiva, Kalvelytė, Audronė Valerija. „Muscle-derived cell lines multipotency and sensitivity to apoptotic stimuli“. Biochemijos studijoms Lietuvoje – 50 metų: Lietuvos biochemikų draugijos XII konferencija. 2012 birželio 28-30, Tolieja. p. 37.
 11. Užsienis, Tomas, **Stulpinas**, **Aurimas**, Kalvelytė, Audronė. „Kamieninių bei vėžinių ląstelių funkcionavimo, netekus užląstelinų kontaktų, tyrimai“. Studentų mokslinių tyrimų praktikos 2012/2013 konferencijoje Vilnius, 2013 m. birželio 27- 28.
 12. Baltrūnaitė, Kristina, Kalvelytė, Audronė Valerija, **Stulpinas**, **Aurimas**, Imbrasaitė, Aušra, Krestnikova, Natalija. „Study of JNK signaling pathway in apoptosis regulation of neuro-differentiated cells“. Abstracts

- book of the XIIIth international conference of Lithuanian biochemical society, p. 60. 2014 Birštonas, June 18-20.
13. Kalvelytė, Audronė Valerija, **Stulpinas, Aurimas**, Krestnikova, Natalija, Imbrasaitė, Aušra, Baltriukienė, Daiva, Baltrūnaitė, Kristina. „Differential outcome of JNK inhibition in proliferating and differentiated adult muscle-derived stem cells after chemotherapeutic treatment“. MAP Kinase ISSN 2235-4956 2014, vol. 3, suppl. 1: Life sciences Baltics 2014 Forum: the biochemistry, biology and pathology of MAP kinases II, 10-11 September 2014, Vilnius. p. 10-11.
 14. Krestnikova, Natalija, Imbrasaitė, Aušra, **Stulpinas, Aurimas**, Baltrūnaitė, Kristina, Kalvelytė, Audronė Valerija. „The role of JNK in cisplatin induced apoptosis of adult muscle stem cell-derived adipocytes“. Abstracts book of the XIIIth international conference of Lithuanian biochemical society, p. 36. 2014 Birštonas, June 18-20.
 15. **Stulpinas, Aurimas**, Imbrasaitė, Aušra, Krestnikova, Natalija, Užusienis, Tomas, Šarlauskas, Jonas, Čėnas, Narimantas, Miliukienė, Valė, Kalvelytė, Audronė Valerija. „A comparative study of bioreductive agent RH-1-induced signalling pathways in human lung cancer cell line A549“. 50th anniversary of FEBS : Abstracts book of The XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, June 18-20, 2014 p. 43.
 16. **Stulpinas, Aurimas**, Imbrasaitė, Aušra, Krestnikova, Natalija, Šarlauskas, Jonas, Čėnas, Narimantas, Kalvelytė, Audronė Valerija. „Study of bioreductive agent RH1-induced signals leading the wild-type p53-bearing lung cancer A549 cells to apoptosis“. EMBO conference : Cellular signalling and cancer therapy : abstracts / editors D. Höller, K. Koch, 23rd-27th May, 2014 Croatia. ISBN 9783000454295 p. 207.
 17. Užusienis, Tomas, **Stulpinas, Aurimas**, Krestnikova, Natalija, Imbrasaitė, Aušra, Kalvelytė, Audronė Valerija. „Different involvement of survival kinases in anoikis regulation of cancer and stem cells“. 50th anniversary of FEBS : Abstracts book of The XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, June 18-20, 2014, p. 41-42.
 18. **Stulpinas Aurimas**, Imbrasaitė Aušra, Čėnas Narimantas, Kalvelytė Audronė Valerija. „Different involvement of MAPKs in apoptosis triggered by different oxidative stress-inducing agents“. 22nd Young Research Fellow Meeting. Biology and Chemistry: a permanent dialogue. February 4-6, 2015, Paris (France).
 19. Audronė Kalvelytė, Natalija Krestnikova, **Aurimas Stulpinas**, Aušra Imbrasaitė, Daiva Baltriukienė, Kristina Baltrūnaitė, Goda Sinkevičiūtė. “Stem cells in toxicology: opposite role of stress kinase JNK in regulation of apoptosis in proliferating and differentiated stem cells after

- chemotherapeutic treatment”. LKLTA conference „Stem cell research in Lithuania: past, present and future“ August 27, 2015, Vilnius.
20. **Aurimas Stulpinas**, Tomas Užusienis, Natalija Krestnikova, Aušra Imbrasaitė, Audronė Kalvelytė. “Differences and similarities in anoikis regulation between cancer and stem cells”. LKLTA conference „Stem cell research in Lithuania: past, present and future“ August 27, 2015, Vilnius.
 21. **Aurimas Stulpinas**, Tomas Užusienis, Natalija Krestnikova, Aušra Imbrasaitė, Audronė V. Kalvelytė. „Cell-cell and cell-substratum contacts in the regulation of the signaling molecules controlling eukaryotic cell functioning: importance in cell therapy, biopharmacy and bioproduction“. Life Sciences Baltics, September 14-15, 2016, Vilnius.
 22. **Aurimas Stulpinas**, Aušra Imbrasaitė, Natalija Krestnikova, Audronė V. Kalvelytė. MAPK activation in response to chemotherapeutic drug cisplatin treatment in lung cancer cell lines. XVth international conference of the Lithuanian biochemical society. 2018 June 26-29, Dubingiai. Lithuania
 23. **Aurimas Stulpinas**. Different cell death modalities in normal and cancer cells. XVth international conference of the Lithuanian biochemical society. 2018 June 26-29, Dubingiai. Lithuania
 24. **Stulpinas A. (pranešėjas)**, Sereika M., Krestnikova N., Imbrasaitė A., Kalvelytė A.V. Pranešimas “Assessment of anticancer drug impact on survival signaling pathways in primary lung cancer cell lines”. 27th International Conference on Cancer Research and Oncology. 2019 December 9-10, Barcelona, Spain (Ispanijos Karalystė). eLABa ID 47274600.
 25. “Cell-cell and cell-substratum contacts: impact on MAPK signaling molecules in the regulation of cancer and stem cell functioning”. A. V. Kalvelytė, **A. Stulpinas**, T. Užusienis, N. Krestnikova, A. Imbrasaitė. 27th International Conference on Cancer Research and Oncology. 2019 December 9-10, Barcelona, Spain.
 26. **Aurimas Stulpinas**, Natalija Krestnikova, Aušra Imbrasaitė, Audronė V. Kalvelytė. “Dependence of JNK signaling pathway molecules on intercellular contacts”. The (Extra)ordinary COINS 2021 virtual conference. 2021-03-30. <https://thecoins.eu/wp-content/uploads/2021/03/The-COINS-2021-Book-of-Abstracts.pdf> p.54
 27. **Aurimas Stulpinas**, Monika Tenkutyte, Aušra Imbrasaitė, Audronė V. Kalvelytė. Investigations of stress kinase JNK as a molecular target in the treatment of lung cancer cells. International Conference of Life Sciences The Coins 2022. 2022-03-03, Vilnius (on-line). <https://thecoins.eu/resources/booksofabstracts/COINS2022.pdf> p.118

Mokslinės publikacijos:

MONOGRAFIJOS IR KNYGŲ SKYRIAI

1. **Stulpinas, Aurimas**; Imbrasaitė, Aušra ; Krestnikova, Natalija ; Kalvelytė, Audronė Valerija. Chapter 7: Recent approaches encompassing the phenotypic cell heterogeneity for anticancer drug efficacy evaluation // *Tumor Progression and Metastasis* edited by Dr. Ahmed Lasfar and Karine Cohen-Solal (2020, London, UK): ISBN: 978-1-78985-350-6; DOI: 10.5772/intechopen.89395 p.147-194. <https://www.intechopen.com/chapters/69782>
2. Kalvelytė, A. V.; Imbrasaitė, A.; Krestnikova, N.; **Stulpinas, A.** Chapter 4: Adult Stem Cells and Anticancer Therapy // *Advances in molecular toxicology* Volume 11 edited by James C. Fishbein, Jacqueline M. Heilman (2017, Academic Press): ISBN: 9780128125229. p. 123-202

Mokslo straipsniai žurnaluose, kurie yra įtraukti į Clarivate Analytics duomenų bazę Web of Science (WoS)

3. **Aurimas Stulpinas**, Matas Sereika, Aida Vitkeviciene, Ausra Imbrasaite, Natalija Krestnikova, Audrone V. Kalvelyte. “Crosstalk between protein kinases AKT and ERK1/2 in human lung tumor-derived cell models”. *Frontiers in Oncology*. 2023; 12:1045521. DOI 10.3389/fonc.2022.1045521. IF 5,74.
4. **Stulpinas A**, Uzusienis T, Imbrasaite A, Krestnikova N, Unguryte A, Kalvelyte AV. Cell-cell and cell-substratum contacts in the regulation of MAPK and Akt signalling: Importance in therapy, biopharmacy and bioproduction. *Cellular Signaling*. 2021; 84:110034. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110034. IF 4,3.
5. Abdelwahid E, **Stulpinas A**, Kalvelyte A. Effective agents targeting the mitochondria and apoptosis to protect the heart. *Current Pharmaceutical Design*. 2017, 23(8): 1153-1166. ISSN 1873-4286, IF 2016 – 3.05.
6. Abdelwahid E, Kalvelyte A, **Stulpinas A**, de Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Foldes G. Stem cell death and survival in heart regeneration and repair. *Apoptosis*. 2016, 21(3): 252-68. ISSN: 1360-8185, IF 2015 – 3.7.
7. **Stulpinas A**, Imbrasaitė A, Krestnikova N, Šarlauskas J, Čėnas N, Kalvelytė AV. Study of Bioreductive Anticancer Agent RH-1-Induced Signals Leading the Wild-Type p53-Bearing Lung Cancer A549 Cells to

- Apoptosis. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, 29(1): 26-39. ISSN 0893-228X, IF 2015 – 3.5.
8. Krestnikova N, **Stulpinas A**, Imbrasaitė A, Sinkeviciute G, Kalvelyte AV. JNK implication in adipocyte-like cell death induced by chemotherapeutic drug cisplatin. *Journal of Toxicological Sciences*, 2015, 40(1):21-32. ISSN 0388-1350, IF 2013 – 1.38.
 9. Kalvelytė A, Krestnikova N, **Stulpinas A**, Bukelskiene V, Bironaitė D, Baltriukiene D, Imbrasaitė A. Long-term muscle-derived cell culture: multipotency and susceptibility to cell death stimuli. *Cell Biology International*, 2013, 37 (4): 292-304. ISSN 1065-6995. IF 2013 – 1.6 (IF 2021 – 4.47).
 10. **Stulpinas A**, Imbrasaitė A, Kalvelytė AV. Daunorubicin induces cell death via activation of apoptotic signaling pathway and inactivation of survival pathway in muscle-derived stem cells. *Cell Biology and Toxicology*, 2012, 28 (2):103-114. ISSN 0742-2091. IF 2012 – 2.5 (IF 2021 – 6.8).
 11. Bironaitė D, Baltriukiene D, Uralova N, **Stulpinas A**, Bukelskiene V, Imbrasaitė A, Kalvelyte A. Role of MAP kinases in nitric oxide induced muscle-derived adult stem cell apoptosis. *Cell Biology International*, 2009, 33, 711-719. ISSN 1065-6995. IF 2009 – 1.8 (IF 2021 – 4.47).

Mokslo straipsniai kituose recenzuojamuose mokslo leidiniuose

1. **Stulpinas A**, Kalvelytė AV. Cell Death and Its Different Modes: History of Understanding and Current Trends. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. ISSN: 2231-086X. 2019, 26(1): 1-11. DOI: 10.9734/ijberr/2019/v26i130089.
2. **Stulpinas A**, Bironaitė D, Kalvelytė A. MAPK signalling in skeletal muscle-derived stem cells after daunorubicin treatments. *Biologija (Vilnius)*. ISSN 2029-0578. 2008; 54(3): 221-226.
3. **Stulpinas A**, Bukelskienė V, Kalvelytė A. Different involvement of extracellular signal-regulated kinase ERK in K562 cell apoptosis induced by camptothecin, cisplatin and taxol. *Biologija (Vilnius)*, 2004, 2 (1 priedas): 142-145.
4. Bironaitė D, Kalvelytė A, Imbrasaitė A, **Stulpinas A**. The intracellular antioxidant balance of HL60 cells and its implication in apoptosis induced by quinoidal compounds. *Biologija (Vilnius)*, 2004, 1: 48-51.
5. Bironaitė D, Imbrasaitė A, **Stulpinas A**, Kalvelytė A. Modulation of cJun expression in leukemic cells undergoing apoptosis after chemotherapeutic treatment. *Biologija (Vilnius)*, 2003, 4: 47- 50.

6. Bukelskienė V, Baltriukienė D, **Stulpinas A**, Kalvelytė A. Study of apoptosis and cJun expression in mouse cancer model systems. *Biologija* (Vilnius), 2003, 3: 56-59.
7. Bukelskienė V, **Stulpinas A**, Imbrasaitė A, Jackevičius A, Kalvelytė A. Primary cell lines from lung cancer in a study of apoptosis after chemotherapeutic treatments. *Acta medica Lituanica*, 2002, Supplement 9: 28-32.

Praktiniai įgūdžiai

A. Stulpinas turi didelę darbo patirtį su eukariotinių vėžinių ir kamieninių ląstelių kultūromis, yra įsisavinęs reikalingus molekulinės biologijos, biocheminius bei mikroskopijos metodus. Nuo 2007 metų aktyviai prisideda ruošiant mokslines publikacijas, nuolatos kelia kvalifikaciją mokslinių tyrimų bei paraiškų rengimo/teikimo srityse. Yra įvaldęs fotografavimo, filmavimo ir vaizdo apdorojimo technikas. Nuo 2010 metų rašo bei administruoja mokslinius projektus, dalyvauja viešuosiuose pirkimuose, vadovauja studentų mokslinėms praktikoms ir baigiamiesiems darbams.

SANTRAUKA

Abbreviations

A549 – human lung carcinoma of basal epithelial cells
AKT – cytoplasmic serine/threonine kinase
AKTi – AKT inhibitor VIII
APC – red color fluorescent dye, used in flow cytometry
CAP – capivasertib, AKT inhibitor, targeted drug
CSC – cancer stem cells
CD24, CD44, etc. – cell surface markers for characterization
DM – DMSO – solvent dimethyl sulfoxide
ECM – extracellular matrix
ERK – extracellular signal-regulated kinase
FAK – focal adhesion kinase, signaling from the integrins
FDA – Food and Drug Administration
FITC – green color fluorescent dye, used in flow cytometry
IDE – idelalisib, inhibitor of PI3K, targeted drug
cJUN – transcription factor, a substrate of JNK; cJun
JNK – cJun N-terminal kinase; also known as SAPK
K562 – human lymphoma-derived cell line, cultured in suspension
LCL1, LCL2... – „lung cancer cell line No.1, 2“, primary lung cancer-derived cell lines
MAPK – mitogen-activated protein kinase
MEK – MAPK ERK kinase
MFI – median fluorescence intensity (in flow cytometry)
Myo – adult rabbit muscle-derived stem cell line (healthy)
NSCLC – non-small cell lung cancer
P38 – MAP kinase of 38 kDa; MAPK14
PBS – phosphate buffered saline
PE – fluorescent dye, used in flow cytometry
SAPK – stress-activated protein kinase (a part of MAPK; contains JNK and P38)
SDS-PAGE – sodium dodecylsulphate poly-acrylamide gel electrophoresis
SEL – selumetinib, MEK inhibitor, targeted drug

INTRODUCTION

Cancer is one of the most common diseases worldwide, making the efficacy of anticancer drugs and the resistance to chemotherapy a very sensitive issue. Cancer is both a genetic and a cellular disease, and its diversity is infinite. Therefore, cancer research remains a challenge not only at the biochemical level but also at the cellular level. Individualized therapies based on established biomarkers are very expensive and often ineffective for many reasons. One promising approach for breakthroughs is the use of small molecule compounds that interact specifically with intracellular signaling molecules. Over 100 protein kinase inhibitors are already being tested in clinical trials. Pre-clinical (in vitro) studies are an essential part of this process [1], [2].

Cancer is a disease caused by alterations in genes encoding regulators of cell proliferation, apoptosis and differentiation. Although funding for cancer research and treatment has increased dramatically over the last 30 years, cancer has managed to overtake cardiovascular disease and ranks first worldwide in mortality. Discovery of cancer stem cells (CSCs) has given hope that scientists have finally understood the nature of cancer and the essential target for treatment. However, it was soon discovered that adult stem cells and cancer stem cells have much more in common than we would like [3]; moreover, normal stem cells have been found in close proximity to the tumor, either limiting or stimulating its growth [4].

Lung cancer is the leading cause of cancer deaths. Despite the advances, there is still a great need for new, innovative treatment strategies and tools. Such tools include lung tumor cell lines derived from patients. These ex vivo cells are important in the investigation of the basic survival mechanisms of lung tumors and in development of new anti-cancer targets and compounds. Cell lines have been shown to retain the same genetic alterations as the primary tumor [5]. The lung stem and lung cancer stem cells provide another important tool for the effective application of targeted therapies in defeating lung cancer [6], [7].

Lung cancer can be treated with surgery, chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy and targeted therapies, depending on the stage of the cancer. Surgery is usually considered an inappropriate treatment option when the stage of lung cancer diagnosed is already advanced. Chemotherapy is one of the main and most effective treatments for lung cancer, whether used alone or in combination with other treatments [8][9].

Current trends in cancer biology and cancer treatment are largely focused on addressing drug resistance. New evidence suggests that, in addition to oncogenic rearrangements, non-genetic causes of resistance are driving cancer. Understanding the mechanisms of non-mutant cellular resistance, as well as new models for drug sensitivity testing, must be important in the search for new cancer therapies.

Despite advances in biomarker-based personalized cancer therapy, molecular/genetic profiling has been shown to be insufficient in identifying effective drug combinations in many cases. New reports show that the success of anticancer treatment is usually limited by tumor heterogeneity, which is not detected by existing cancer biomarker-based approaches. Cellular heterogeneity, not only genetic but also phenotypic, is considered to be a major cause of resistance to anticancer therapy, cancer progression and cancer stem cell survival [10]. Therefore, identification of effective drug combinations requires functional studies of live cells representing different tumor cell types.

The activity of signaling molecules that regulate cell fate is an important determinant of cell behavior, as well as their response to treatment, depending on the phenotypic state of the cell and its location in the organism. Cell fate is determined by both survival and death signals, which may have different roles depending on the cell type, developmental stage and the nature/intensity of the stimulation. Understanding the cell death signaling networks involved in anticancer drug therapy is crucial in the search for new drug targets and biomarkers for cancer therapy. Phosphorylation of intracellular signal-transducing protein kinases in the absence of drugs and inhibitors will be referred to as “basal phosphorylation” in this work.

Understanding the signal transduction networks of programmed cell death upon exposure to anticancer drugs is an essential way to identify new drug targets and biomarkers in cancer therapy. There are many studies that analyze the molecular differences between healthy and cancerous, between sensitive and resistant, between control and affected cells. Manipulating the signals induced by chemotherapeutic drugs is a promising strategy for targeted cancer therapy.

The relationship between cell status and therapeutic sensitivity, and hence cell fate, is determined by the activity of signaling pathways, including the MAPK and PI3K/AKT kinases, which are influenced by both intrinsic and extrinsic sources. MAPK and AKT regulate essential cellular functions such as proliferation, survival, growth, metabolism, migration and differentiation. ERK and AKT transmit extrinsic and intrinsic signals from growth factors,

intracellular stress (including DNA damage), extracellular contacts and adhesion signals. These signaling pathways are key mediators of oncogenic signaling (activated ERK and AKT pathway molecules are frequently found in many human cancers). Mutations are also known in the signaling pathway itself. MAPK and AKT also mediate cellular responses to anticancer drugs. Deregulation of these kinase signals is often associated with resistance to the treatment.

MAPK and AKT kinases are therefore attractive targets to improve the efficacy of targeted or conventional chemotherapy. Accordingly, inhibition of these two major signaling pathways has been newly proposed as a promising and alternative treatment for lung cancer [11].

Cancer therapy is moving away from non-specific cytotoxic drugs towards rationally designed molecule-specific compounds with higher efficacy and fewer side effects. This requires a good understanding of cancer biology and identification of the "active" molecular targets of the disease. However, despite the advances in biomarker-based personalized cancer therapies, only short-term effects have been observed, and in some patients they do not work at all. Also, additional research is still needed on how anticancer drugs affect adult stem cells and how they can be protected.

Targeted cancer therapy, where a patient's sample is tested for specific gene mutations before treatment, has been in use for more than 20 years (imatinib was approved by the FDA for the treatment of cancer in 2001) [12]. Unfortunately, cancer cells acquire resistance. Our position is that the mechanisms by which a cell acquires resistance to death inducers may be activated by non-genetic events that depend on the cell's status, stage of differentiation, and alterations in microenvironment.

This thesis aims to evaluate the modifications of cell death/survival signaling molecules, their interactions and their role in different cellular states after loss of cell-substratum contacts and after exposure to conventional or targeted anticancer drugs and combinations thereof.

We used commercial lung adenocarcinoma A549 and ex vivo primary lung cancer cell lines derived from patients. As control, healthy cells, we used the rabbit muscle stem cell line Myo for comparison, which has been derived in our laboratory as well as described and characterized in our previous papers.

In this study, the efficacy of the conventional chemotherapeutic drug cisplatin (cis-diaminodichloro platinum II) and targeted drugs selected to inhibit intracellular protein kinases were tested by treating cells with a single drug or various combinations of drugs. In assessing the efficacy of a drug, the

aim was to focus on extracellular contacts and the molecular mechanisms of drug action.

We investigated basal, extracellular contact-dependent and anticancer drug-induced activation of signaling molecules, the role of the signaling (cell death-inducing or protective), and the relationship between the signaling molecules. The studies modelling cell-cell interactions were performed in different states, i.e. with adherent cells (2D), in cellular aggregates (3D), and in single cell suspension (0D).

In our studies, a set of drugs targeting MAPK and AKT signaling pathways that are in various stages of clinical trials and FDA approval was used. The aim was to determine the expression, phosphorylation and localization of the targets and other signaling molecules, as well as the crosstalk between selected signal transducing molecules in response to cell-cell contacts and drug treatment. Our research focuses on the MAP kinases ERK, JNK and AKT, the drugs that act on these kinases, and their combinations with conventional chemotherapeutics for lung cancer. These ERK inhibitor SCH772984, MEK inhibitors trametinib and selumetinib, AKT inhibitor capivasertib, AKT inhibitor VIII, PI3K inhibitor idelalisib, and the anti-cancer drug cisplatin. The efficacy of the targeted drugs in vitro (target modifications, impact on proliferation/viability and conventional drug-induced death) was characterized. Activation of alternative kinase in cells after exposure to targeted drugs was investigated as a possible mechanism of resistance to targeted therapy.

In this work, we have focused on cells without extracellular contacts. They were kept in suspension to simulate the 'weightless' state in which circulating/metastatic cancer cells spend part of their time. Studies in such a model provide a separate insight into the signaling molecules of unattached cells (either singly or in 3D aggregates) and their role in the response to anticancer therapy. There are not many such studies in the world.

The aim of this study – to ascertain the dependencies of protein kinase MAPK and AKT activation on extracellular contacts, and to confirm the phenomenon of crosstalk between these kinases in different human non-small cell lung cancer-derived cellular models.

The following tasks were raised:

1. To determine the influence of cell-substratum contacts on basal phosphorylation and expression of kinases MAPK and AKT, and the role of these kinases in lung cancer and muscle-derived cell models;
2. To assess the dependence of MAPK JNK signaling pathway molecules – kinase JNK and transcription factor cJun – on cell-cell contacts in lung cancer and muscle-derived cell lines;
3. To evaluate the effect of drugs targeting molecules of the MAPK ERK and AKT signaling pathways on the viability of lung cancer-derived cells, as well as on the molecular targets of the drugs, either alone or in combination with the anticancer drug cisplatin;
4. To determine the existence of interaction between ERK and AKT signaling pathways in different cell lines of lung cancer origin;
5. To assess the dependencies of ERK and AKT crosstalk on cell-substratum contacts and concentration of cisplatin.

SCIENTIFIC NOVELTY AND PRACTICAL VALUE

Current trends in cancer biology and cancer treatment are largely focused on tackling drug resistance. It is known that cancer is caused by mutations in genes responsible for oncogenic transformation, but there is increasing evidence that resistance is caused by non-genetic factors. It is recognized that non-genetic mechanisms, in addition to genetic alterations, are involved in drug resistance and tumor progression. Cancer cells can acquire resistant phenotypes through epigenetic modifications, changes in signal transduction and other non-genetic mechanisms, depending on extracellular and intracellular factors related to the tumor microenvironment. It is known that non-genetic modulation of cellular state can strongly influence drug response. Cell status-targeted therapies are becoming one of the main trends in modern cancer treatment.

Understanding non-mutational mechanisms of resistance, as well as introduction of new models for drug sensitivity testing, are important in the search for better cancer treatment. A growing body of evidence shows that three-dimensional (3D) cancer models have a potential to deepen our understanding of cancer biology, which has historically been studied in tumor-derived cell cultures on the rigid surface of plastic plates. 3D *ex vivo* models are already replacing existing *in vitro* systems and may reduce or even replace the use of animal models in the future. A major advance in 3D cell culture systems is the development and use of spheroid and organoid cultures to assess the efficacy of standard and targeted therapies. Models of different cellular states may differ in the activity of signaling molecules and in the regulation of signal transduction pathways responsible for cell fate decisions.

This work focuses on non-genetic mechanisms of cellular response to anticancer therapy and resistance to therapy. The relationship between cell state and therapeutic sensitivity, and hence cell fate, is determined by the activity of signaling pathways, including the MAPK and PI3K/AKT kinases, which are influenced by both intrinsic and extrinsic sources.

In this study, the influence of extracellular contacts on the activation of the signalling molecules AKT, MAPK (ERK, JNK, p38), and the transcription factor cJun in different *in vitro* cell systems (lung adenocarcinoma A549 cell line, primary lung cancer cell line, and a muscle-derived stem cell line) was examined by modelling different cellular states. It has been shown that, irrespective of cell origin or cell phenotype, the basal phosphorylation level of the protein kinases is dependent on the cell-cell and cell-substratum contacts. Importantly, activation (phosphorylation and expression) of

molecules in the same JNK signaling pathway was inversely dependent on intercellular contacts.

In summary, the comparison of the phosphorylation profile of protein kinases in different cell states - single, adherent or aggregated cells - in this study highlighted the importance of the extracellular environment and showed differences between cell lines. The dependence of cell fate-regulating protein kinases on extracellular contacts also shows that cell regulation is dependent on the context in which the cells are situated. Overall, cell adhesion (to other cells or to the substrate) is an important factor in determining cell fate, in addition to other well-known developmental signals.

Knowledge of the basal activity of signaling molecules is important for predicting the response of cells to changing conditions and thus for predicting cell behavior during biotechnological and biomedical processes. Understanding the influence of cellular contacts on the activation/deactivation of cell fate-regulating kinases is also important for the prediction of the response to anticancer therapy. Studies based on the state of the cells and their location in the body (in solid tissue or circulating in liquid) would also allow the prediction of different effects on those cells.

Also, in this work, using cell models of human lung cancer origin, we have shown that the negative feedback phenomenon of the two survival signaling pathways, MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT, is characteristic of all the cell lines investigated. Despite differences in cell phenotype or genotype, inhibition of the PI3K/AKT pathway promoted activation of the MAP kinase ERK and, conversely, inhibition of the MEK/ERK pathway increased the level of phosphorylated AKT. This phenomenon was confirmed in both control and cisplatin-treated cells, also using different inhibitors of these kinases. Although this interaction is thought to be cell type-specific and/or dependent on the particular oncogenic lesion in the cell, the results suggest that activation of an alternative kinase in response to inhibition of another kinase is a universal phenomenon. Activation of an alternative kinase in cells is a possible mechanism of resistance to targeted drugs.

On the other hand, we have shown that the crosstalk between ERK and AKT signaling pathways is dependent on cell-substratum contacts, with the loss of feedback upon detachment from the substrate. Inhibition of the focal adhesion kinase FAK by its inhibitor PF573228 also results in similar outcome. The interaction of the kinases may also depend on the strength of the chemotherapeutic stimulus.

Activity of signaling molecules that regulate cell fate is an important determinant of cellular response to the treatment, when taking into account the phenotypic state of the cells and their location in the body. This work

highlights the dependence of adherent cell function and response to targeted drugs on cellular state, and proposes different molecular strategies to target contacting (solid tumor) and circulating cancer cells. We believe that the findings of this work may be relevant to address the problems of personalized cancer treatment and drug resistance.

STATEMENTS TO DEFEND

- Basal phosphorylation of the kinases MAPK and AKT is dependent on cellular state, i.e., it is different in attached or floating lung cancer-derived cells.
- Components of the same JNK signaling pathway – kinase JNK and transcription factor cJun – are differentially affected by intercellular contacts.
- The effect of MAPK ERK- or AKT-targeted drugs and their combinations with the conventional drug cisplatin varies between lung cancer-derived cell lines.
- Bidirectional negative feedback loop exists between MEK/ERK and AKT signaling pathways in all the studied human lung cancer-derived cell lines.
- Interaction between the ERK and AKT signaling pathways is dependent on extracellular contacts as well as on the concentration of cisplatin.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human non-small cell lung adenocarcinoma A549 cells were purchased from CLS (Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany). K562 cells were obtained from ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Human primary lung cancer cell lines were established from surgical material (Regional bioethical approval no. 158200-18/5-1024-537). Briefly, lung tumor specimens were minced, washed, and enzymatically digested. The digested tissue was filtered through a cell strainer and transferred into a cell culture flask with Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM, Gibco, # 21980032) supplemented with 10% FBS (Gibco, #10500064) and antibiotics (Gibco, #15240062). Cells were grown at various densities and under different culture conditions. Cells of passage number 10–30 were used in our experiments. Rabbit muscle-derived cell line Myo was used as a representative of a normal/healthy stem cells. It was established from the anterior tibial thigh muscle of an adult rabbit at the Institute of Biochemistry (Lithuania). The stem-cell nature of Myo cells has been proven by the expression of stem cell markers, unlimited proliferative potential, and multipotency *in vitro* (Kalvelytė et al, 2013). Routinely all cells were cultivated in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂ in IMDM with 10% FBS and antibiotics. Agitation experiments were performed in an environmental orbital shaker-incubator (ES-20/60, Biosan, Riga, Latvia) at 37°C in CO₂-independent medium (Gibco, #18045088) supplemented with glutamine, 10% FBS and antibiotics.

Cell morphology

Cell morphology was observed, and the micrographs of the cells were obtained with an EVOS FL microscope (Thermo Scientific) using 10x objective with phase contrast for brightfield. Cell staining was performed with crystal violet (0.1% in 20% ethanol) dye. Fluorescent pictures were obtained with the same EVOS FL using mixture of acridine orange and ethidium bromide dyes (AO/EB; 1 mg/mL and 1 mg/mL in PBS, final concentration 10 µg/mL). GFP and RFP LED light cubes (ex 531/40, em 593/40 and ex 470/22, em 525/50, respectively) within the instrument were used for the photographs, subsequently merging two color images into one. Scalebars 400 µm.

Inhibition and prevention of cell adhesion

To mimic the anchorage-independent state of circulating cells we maintained the cells in suspension for 24 - 72 hours during the experiments. In order to prevent their adhesion to tissue culture plates, trypsin-detached cells in CO₂ medium were placed in non-treated cell culture flasks (Eppendorf Austria GmbH, Vienna, Austria, #0030711017) and constantly agitated at 90 rpm (orbit 20 mm) for 24 hours in an orbital shaker-incubator. For further experiments, the suspension was fractionized into single-cell and aggregated cell fractions by natural sedimentation (1 hour in a vertical 15 mL tube at 37°C). Single cells were concentrated by centrifugation, resuspended in fresh medium, and transferred into non-treated 12-well plates (Eppendorf, #0030721012) for inhibitory studies.

For focal kinase FAK inhibition studies cells were seeded into standard 6-well tissue culture-treated plates (Corning, New York, USA, #353046) for adhesion. Then, FAK inhibitor PF573228 (Merck) was added (5-25 μ M) in new medium for 24 hours. Thereafter, cells were lysed and extracted proteins were analyzed by the Western blot method.

Cell culture density studies

To evaluate the role of cell-cell contacts on JNK/c-Jun signaling network under adherent conditions, cells were seeded at various densities from very sparse to confluent by doubling the cell density to reach confluence at 24 hours. Confluent cells were rated as 1.

Inhibitory analysis and apoptosis assay

Cell number before the experiments was ascertained by Bio-Rad TC20 automatic cell counter after trypsinization (TrypLE, Gibco, #12604013). Resazurin-based redox metabolic assay (stock concentration 0.1% of resazurin (Sigma-Aldrich #R7017) in water; dilution 20-50X) was used to monitor cell viability in suspension and aggregated cell populations measuring fluorescence (excitation 530 nm, emission 580 nm) in a Varioskan Flash plate reader (Thermo Scientific). “Cell viability” in Section 3 figures stands for the normalized ratio of measured value after the treatment with initial control sample resazurin fluorescence value. Normalization was done estimating the DMSO-treated control as 1.0. The role of signaling molecules in anoikis was evaluated using specific inhibitors. The following inhibitors were used in this study: PI3K inhibitor LY294002 (10 μ M, Sigma-Aldrich); Akt inhibitor VIII

(10 μ M, Merck); MEK1/2 inhibitors PD 98059 (20 μ M, Calbiochem), selumetinib AZD6244 (10 μ M, Selleck Chemicals, Houston, TX, USA); JNK inhibitor SP600125 (20 μ M, Merck); p38 inhibitor SB203580 (10 μ M, Calbiochem); FAK inhibitor PF573228 (10 μ M, Merck), proteasomal inhibitor MG132 (10 μ M, Calbiochem).

The mode and percentage of cell death was determined by fluorescence microscopy using two fluorescent dyes: Acridine orange and Ethidium bromide (AO/EB, from Sigma-Aldrich). AO dye was used to visualize chromatin condensation while EB discriminated cell membrane integrity in order to identify the apoptotic cell morphology (anoikis) and fraction in population as described in [13]. Cells were examined microscopically and characterized as follows: viable (green chromatin fluorescence), viable apoptotic with fragmented nuclei (green fragmented chromatin), nonviable apoptotic with fragmented nuclei (orange fragmented chromatin), necrotic cells (orange non-fragmented nuclei), and chromatin-free cells (weak staining). To measure cell distribution in a population according to this staining, not less than 200 cells for each sample were manually counted and described. Representative distributions of cells are presented in the diagrams from at least 3 independent experiments.

Western blotting

Phospho- and total protein amounts of selected signaling molecules were visualized by using secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (goat anti-rabbit and goat anti-mouse) from Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA, #1721011 and #1706515) and an enhanced chemiluminescence reagent (Bio-Rad, #1705060). Representative Western blots from at least 3 independent experiments that resulted in similar outcome are presented. Total protein staining either in PAA gel with Coomassie R-250 brilliant blue dye (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA, #24615) or Pierce Reversible Protein Stain Kit for PVDF Membranes (Thermo Scientific, #24585), served as loading controls. Primary antibodies used: pT308 Akt (Cell Signaling, #2965), pT202-pY204/pT185-pY187 ERK1/2 (Santa Cruz #sc-16982-R), pY397 FAK (Invitrogen #44-624G), pT180/pY182 p38 α (Thermo Scientific MA5-15177), pT183/pY185 JNK (BD #612540), c-Jun (BD #610326), pS63 c-Jun (BD #558036), ERK2 (Santa Cruz #sc-1647).

Densitometric analysis

Western blot and PAA gel images are imported into ImageJ program (v. 1.53e, NIH) and their colors are converted to a 16-bit color palette (Image>Type). Once all the lanes to be analyzed have been defined in a rectangle, Analyze>Gels>Select first lane option is selected, then >Plot lanes. On the resulting diagram, the segments separating the individual electrophoresis lanes are manually added (*Straight* tool). A straight line is to be drawn horizontally within the plot, below which the background signal remains. The Wand (tracing) tool is then used to trace the areas of each lane, which is automatically converted into relative intensity units. The results are normalized to the according PAA gel lanes before comparing within the experiment group.

Flow-cytometric analysis

Cells were washed with PBS + 1% bovine serum albumin and stained with specific antibodies for 30 min. in the dark. They were then washed again and analyzed with FACS Aria II flow cytometer/sorter (BD Biosciences). Non-specific staining was assessed using fluorochrome-, isotype- and species-matched isotype controls. Gates were placed according to respective isotype control staining. Data was analyzed with BD FACSDiva software. All monoclonal antibodies and isotype controls, used in this study, were directly conjugated to fluorochromes. Results are presented as per cent (%) of stained cells, all normalized to isotype control staining.

Statistical analysis

The data are expressed as means (\pm SD) of at least three independent experiments performed in quadruplicate. Paired *t*-test to compare two means was used for statistical analysis (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

In the first part, the main studies were performed with A549 cells. The non-small cell lung carcinoma A549 cell line is known as a wild-type tumor suppressor TP53-bearing and *K-RAS* mutation-driven cancer cell line. In addition, a panel of genotypically and phenotypically different patient-derived lung cancer (NSCLC) primary cell lines was used in our studies. Cell lines were obtained from patients without genetic characterization (Regional bioethical approval no. 158200-18/5-1024-537). The photos presented in Fig. 1 show cells of different sizes with epithelial or fibroblastic phenotype. Rabbit skeletal muscle-derived cell line Myo with stem cell properties, unlimited proliferative potential, and multipotency *in vitro* [14], was chosen as the noncancerous stem cell control.

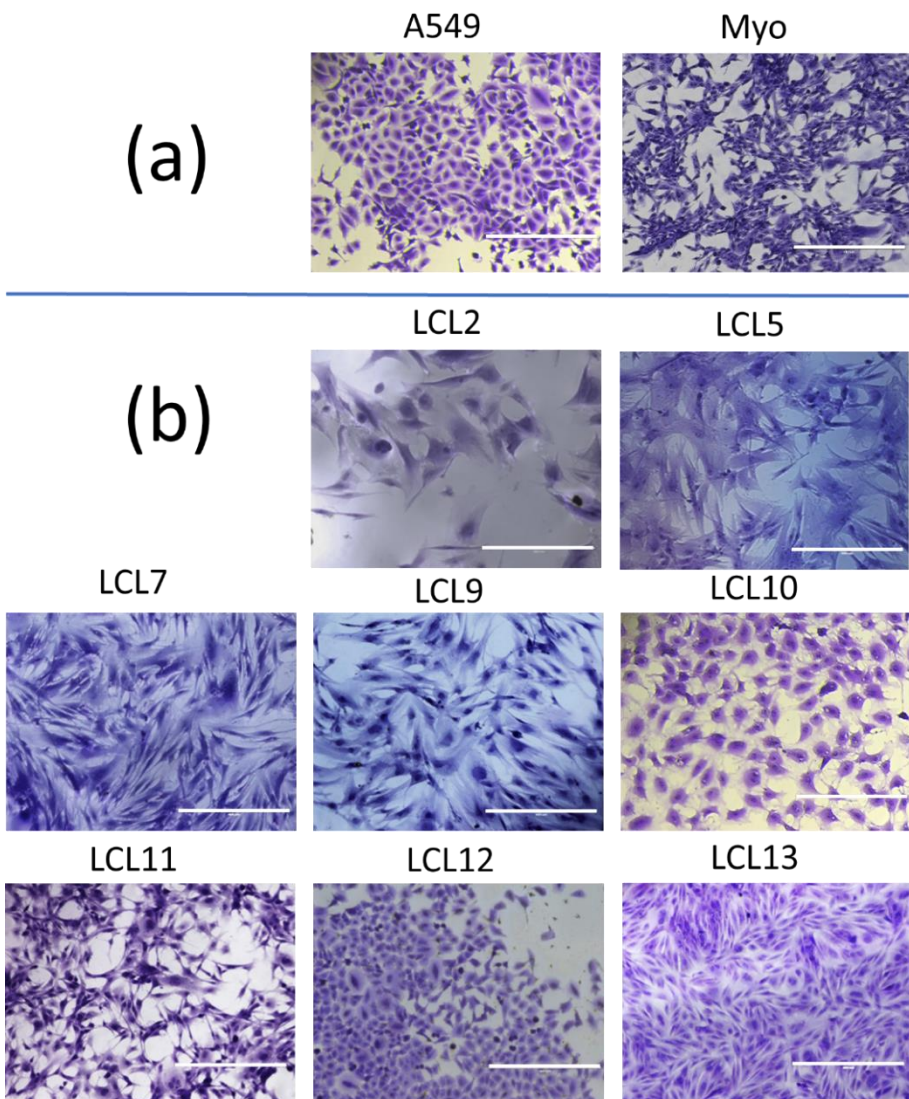


Fig. 1. Selected cell lines were used in this study. (a) Human non-small cell lung carcinoma A549 cell line shows epithelial phenotype. The rabbit muscle-derived stem cell line Myo represents normal (non-cancer) cells. (b) Human lung cancer-derived primary cell lines (LCL) used in the study. Cellular morphology shows epithelial-like and mesenchymal-like (fibroblastic) cells of different sizes. Cells were stained with crystal violet dye. Scale bar 400 μm . Every number indicates a different cell line. (Copyright © 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034).

As the author of this Elsevier article, Aurimas Stulpinas retains the right to include this and the following figures/tables in a thesis or dissertation,

provided it is not published commercially. Permission from Elsevier is not required).

Flow cytometric analysis revealed that established human non-small cell lung cancer-derived primary cell lines variously expressed putative lung cancer stem cell surface markers (Table 1).

Table 1. Flow cytometry data for putative cancer stem cell markers.

%	CD24	CD44	CD54	CD56	CD90	CD117	CD133	CD166	CD324	CD325	CD326	HER3
A549	80.1	91	50.3	13	14.1	17.1	28.5	95.6	51.2	40.1	29.5	8.2
LCL2	2.6	93.7	64.2	5.6	91.3	9.8	13.8	62.6	1.8	31.8	0	0
LCL5	1	91.7	68.8	5.9	94.6	7.7	46.8	67.2	0	39.6	0	0
LCL7	0	92.9	72.5	8.1	90.9	–	21.2	72.6	0	51.8	0	0
LCL9	0	45.6	39.7	6.4	83.9	7.1	16.3	69.1	1.5	21.1	0	0
LCL10	4.1	1.8	52.1	40.2	49.5	23.1	67.5	3.5	3.8	94.7	0.8	0
LCL11	4	2.9	36.1	41.6	66.6	64.7	91.5	0	0	96.4	0	0
LCL12	96.8	94.6	31.1	16.7	1.7	27	41	97.4	95	47.6	44.5	69.4
LCL13	89.2	88	7.6	4.3	0	1.3	–	96.7	70.2	30	0.9	–

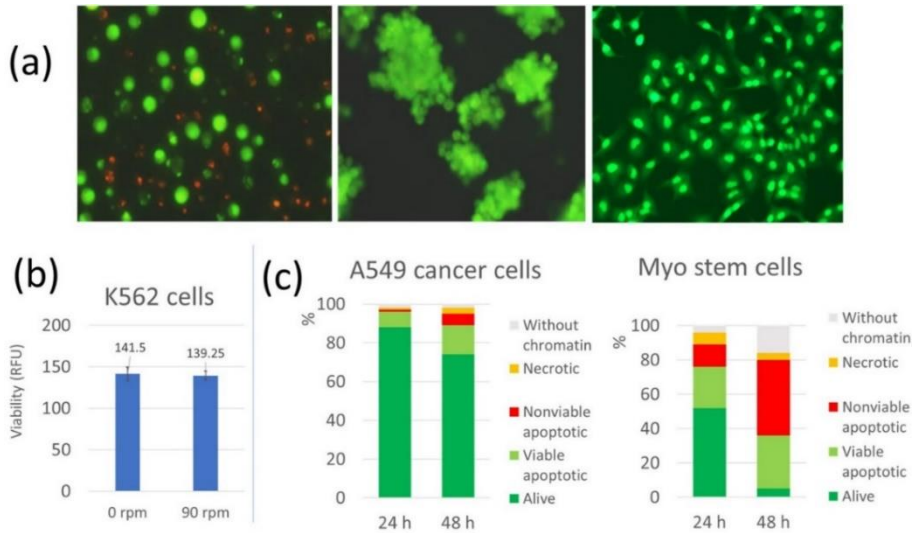


Fig 2. (a) Models of cell interactions used in the study. From the left: single cells kept in suspension (cells without any extracellular contacts); cells in aggregates (cells forming intercellular contacts); cells adhered to the bottom of the culture flask (cells forming both intercellular contacts and contacts with the substrate). Cells were stained with AO/EB dyes as described in the Methods. (b) Agitation of leukemic K562 cells does not reduce their viability. Shaking conditions (90 rpm for 48 h) were tested on non-adherent K562 cells. Control cells were kept in static conditions in the same shaking device. Viability was measured by resazurin reduction method, RFU – relative fluorescence units. $N = 4$, the difference was insignificant. (c) Adherent cells after disruption of cell-substratum contacts (cells in suspension) undergo apoptotic mode of cell death – anoikis. Distribution of cells (in %) according to their morphology evaluated by AO/EB fluorescent staining as described in Methods. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

As expected, detached cells, when losing contacts between cells and with the adhesion substrate, die by apoptosis. Attenuation of integrin-transmitted signals in all examined cells, both cancer and stem, caused features characteristic of apoptosis: chromatin condensation, increase of membrane permeability, and formation of apoptotic bodies. Features of apoptosis were also confirmed by other methods, such as procaspase-3 cleavage, reduction of mitochondrial membrane potential, and DNA fragmentation (data not shown). Quantitative evaluation of anoikis of cancer and stem cells showed that lung

cancer A549 cells were more resistant to death induction by the loss of contacts than muscle-derived stem cells (Figure 2(c) and Figure 3(d)).

On the other hand, the data show that cells retaining cell–cell contacts under non-adherent conditions exhibited higher viability than cells in suspension. As shown in Fig. 3, both types of cells, A549 and Myo, in aggregates were more resistant to the loss of contact with the substratum than single cells in suspension (Figure 3(b,c,d)), showing the protective role of intercellular contacts. These data show that the intercellular contacts that are generally maintained by cadherins may partially compensate the loss of cell-extracellular matrix interactions.

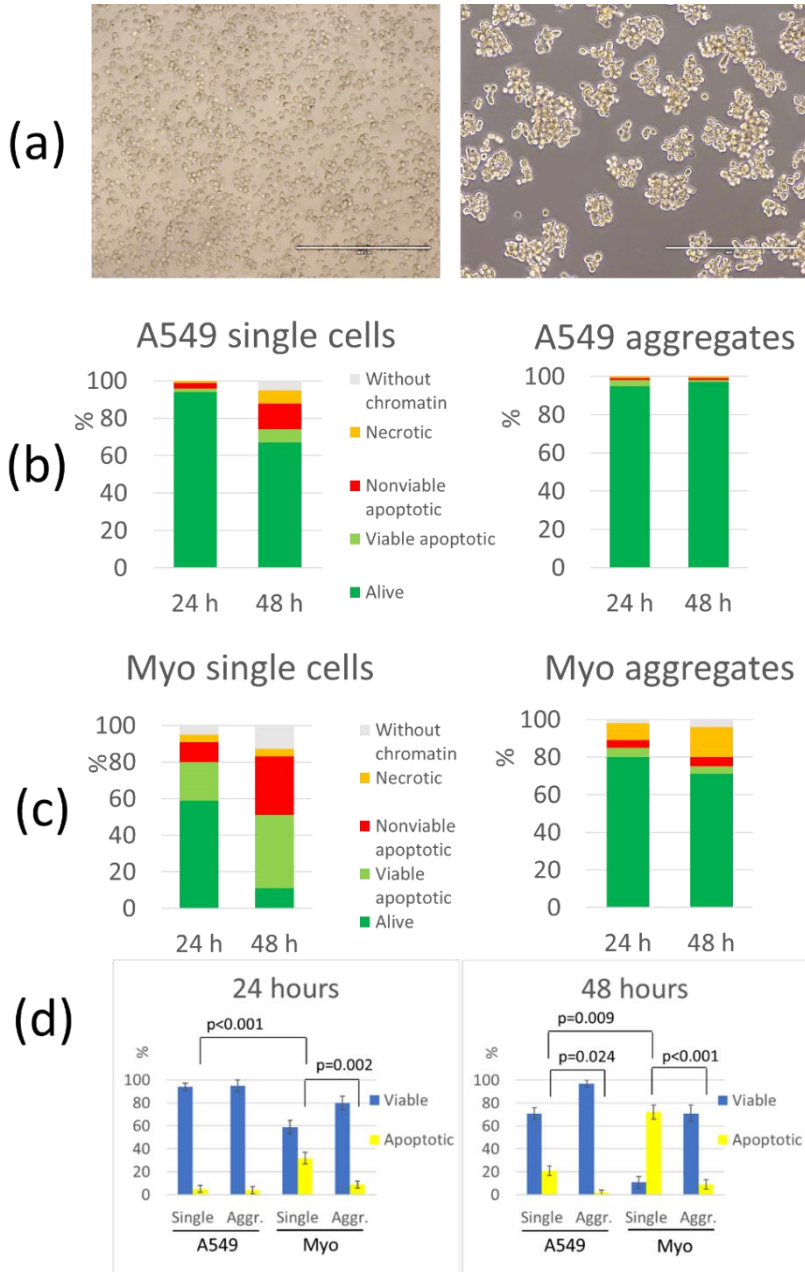


Fig. 3. The role of intercellular contacts under detached conditions on cell viability. (a) Examples of single and aggregated cells in suspension. (b) A549 cells in aggregates are more resistant to the loss of contacts with substratum than single cells. (c) Myo stem cells in aggregates are more resistant to the loss of contacts with substratum than single cells. Distribution of cells (in %) according to their morphology was evaluated by AO/EB fluorescent staining as described in Section 2.5. (d) Statistical analysis of cell viability at 24 and

48 h. Apoptosis in this case includes both viable apoptotic and nonviable apoptotic cells together. Unpaired Student t-test was used to calculate the p value. Aggr. – cells in aggregates. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

Then we used AKT signaling pathway inhibitors and showed that PI3K inhibitor LY294002 resulted in a decrease of cell survival in non-adherent conditions. It reduced the viability of both stem and cancer cells in suspension (Fig. 4(a)). The same inhibition of cell survival was observed by using Akt inhibitor VIII (data not presented). Therefore, AKT kinase is involved in the protection of A549 cells and Myo cells against cell death induced by the loss of cell contacts. Furthermore, in a study of AKT activation, we have shown that cell detachment decreases AKT phosphorylation. Loss of extracellular contacts inhibited AKT phosphorylation at T308 in both A549 and Myo cells (Fig. 4(b)).

Phosphorylation of the focal adhesion kinase FAK was found to decrease in detached cells of both Myo and A549 lines (Fig. 4(c)), showing its dependency on substrate-interacting integrins. We also have demonstrated that FAK inhibition affected AKT kinase phosphorylation. FAK inhibitor PF573228-induced reduction of AKT phosphorylation was shown in both A549 and Myo cells (Fig. 4(d)). However, the level of AKT phosphorylation was found to be higher in death-resistant cell aggregates than in cells in suspension (Fig. 4(e)).

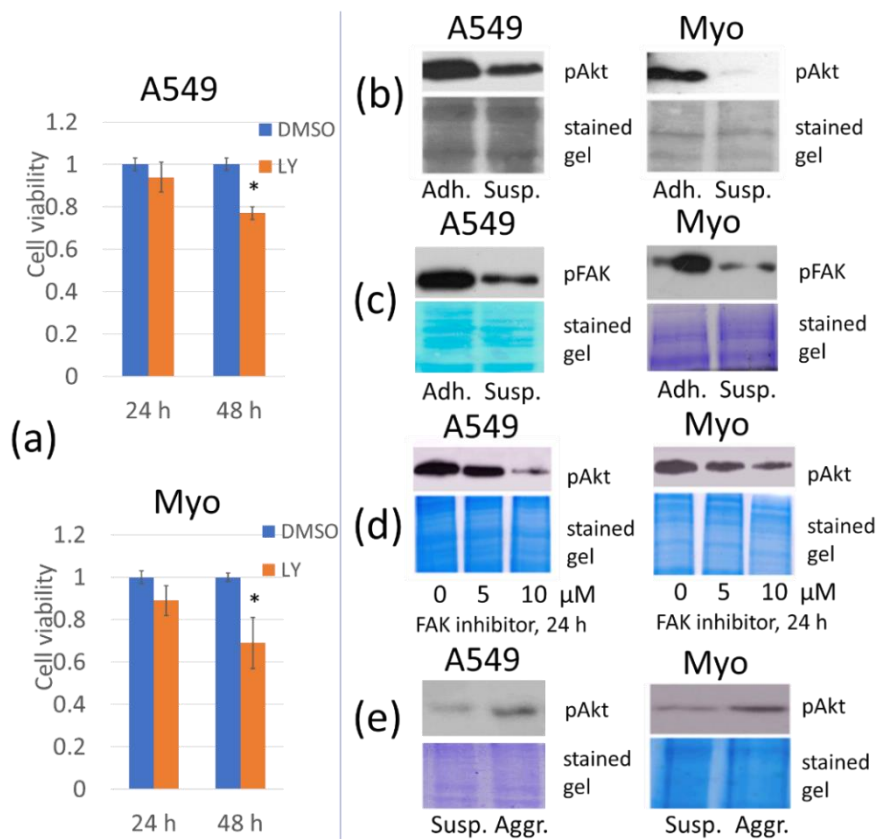


Fig. 4. Dependency of AKT on extracellular contacts. (a) Inhibitor of PI3K/Akt pathway LY 294002 (LY) reduces viability of cells that have lost extracellular contacts. After 24 h of agitation, the aggregates were removed. The remaining single cells grown in suspension for 24 h were treated with 10 μM LY294002 or its solvent DMSO. Cell viability was measured by the resazurin reduction method after 24 and 48 h of treatment. DMSO-treated cell viability was normalized to 1.0. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$, $N = 3$). (b) Protein kinase AKT phosphorylation decreases in cells grown in detached conditions in comparison to adherent cells. FAK is involved in A549 and Myo cell anoikis regulation. (c) Decrease of FAK phosphorylation in cells grown in detached conditions (cells in suspension) for 24 h. (d) FAK inhibitor PF573228, at indicated concentrations, decreases AKT kinase phosphorylation in both A549 and Myo cells. (e) Cells in aggregates show higher AKT phosphorylation level than single cells in suspension. Coomassie blue-stained SDS-PAGE gels serve as loading controls. Adh. – adherent cells, Susp. – single cells in suspension, Aggr. – aggregated cells. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

Inhibitor of ERK signaling pathway PD98059 augmented cell death of both A549 and Myo cells during anoikis (Fig. 5), as well as other MEK inhibitors U0126 and selumetinib (data not presented). Thus, we identified the protective role of ERK in cells that have lost extracellular contacts.

Unexpected results were obtained by investigating the dependency of ERK phosphorylation on cell-substrate contacts. Comparison of ERK kinase phosphorylation in substrate-adhered cells and cells in suspension showed a difference in Myo stem cells and cancer A549 cells (Fig. 5(b)). Similarly, using an inhibitor of FAK, which transmits the cell-substrate interaction signal, we have shown that it reduced ERK phosphorylation in Myo cells but promoted its phosphorylation in cancer A549 cells (Fig. 5(c)). This phenomenon requires further investigation.

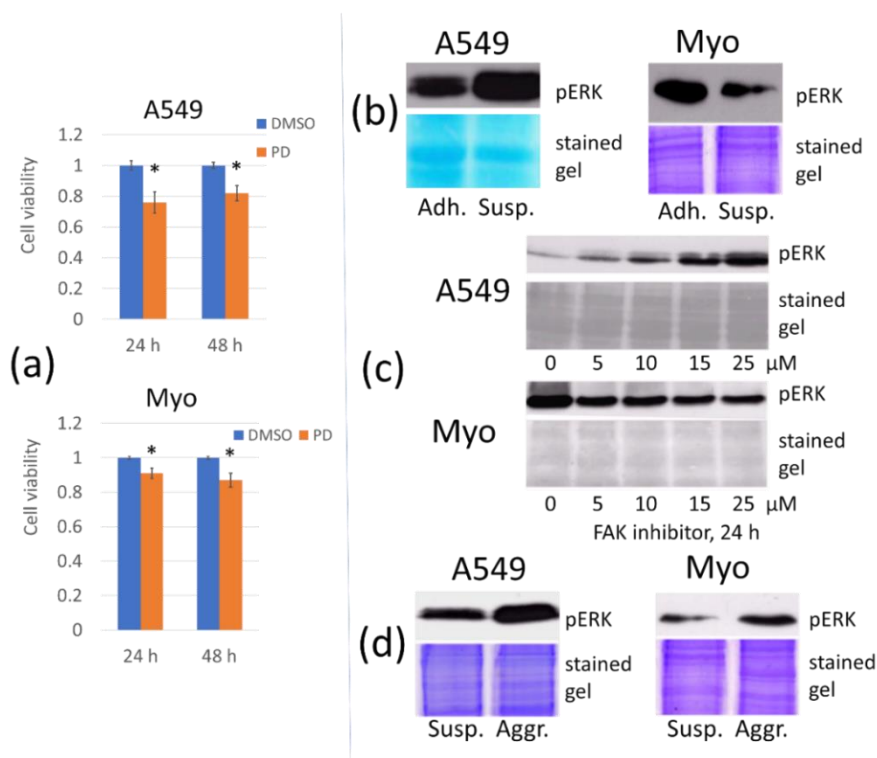


Fig. 5. MAP kinase ERK1/2 dependency on extracellular contacts. (a) Inhibitor of MEK1/2 PD98059 (PD) reduces viability of cells that have lost extracellular contacts. After 24 h of agitation, the aggregates were removed. The remaining single cells grown in suspension for 24 h were treated with 20 μM of PD98059. Cell viability was measured by the resazurin reduction method after 24 and 48 h. DMSO-treated cell viability was normalized to 1.0. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$, $N = 3$). (b) Loss of cell

contacts with substrate regulates ERK phosphorylation in A549 cancer and in Myo stem cells in an opposite manner. Protein kinase ERK phosphorylation increases in A549 cells grown in detached conditions in comparison to adherent cells but decreases in Myo cells. (c) FAK is differently involved in ERK regulation in A549 and Myo cells. FAK inhibitor PF573228 increases ERK phosphorylation in A549 cells but decreases in Myo stem cells. PF573228 (5–25 μ M) was applied to the adherent cell cultures. (d) Cells in aggregates show a higher ERK phosphorylation level than single cells in suspension. Cells were lysed after 24 h of incubation. Adh. – adherent cells, Susp. – single cells in suspension, Aggr. – aggregated cells. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.celsig.2021.110034.)

Next, we used the same assays to investigate the effect of extracellular contacts on kinase phosphorylation in cells obtained from lung cancer patients. Cell-substratum contact-dependent ERK and AKT activation was demonstrated in primary lung cancer cell lines. The data obtained show that the examined primary lung cancer cells lose ERK and AKT phosphorylation when in suspension (Fig.6). In addition, the data showed that there was a higher level of phosphorylated ERK in the cell aggregates than in cells in a suspended state (Fig. 7(a)), suggesting that cell-cell contacts increase phosphorylation of this prosurvival kinase, whereas there were no significant differences in phosphorylation of AKT between aggregated cells and single cells in suspension.

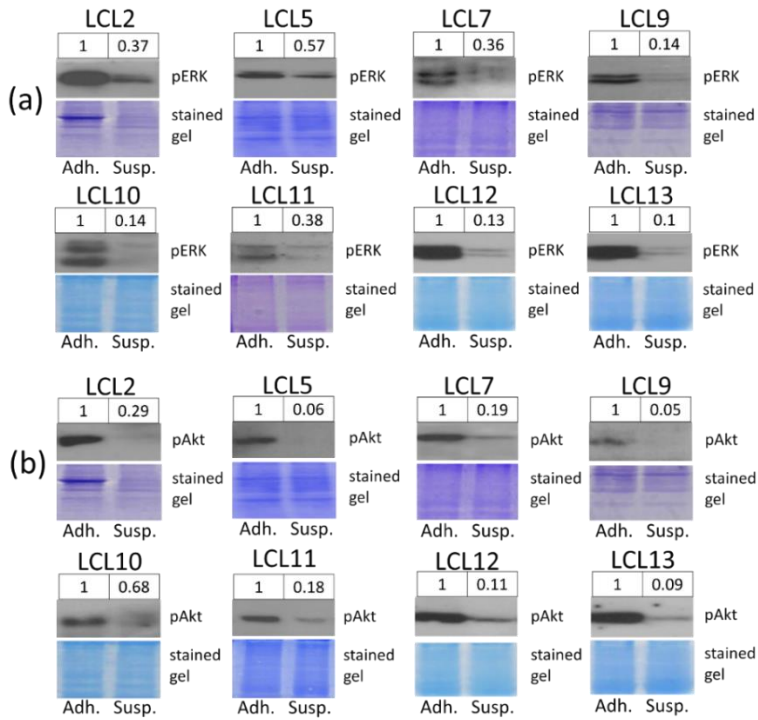


Fig. 6. Primary lung cancer cells in suspension lose ERK1/2 (a) and AKT (b) phosphorylation. Numbers above the blots indicate relative band intensity. Adh. – adherent cells, Susp. – single cells in suspension 24 h under agitation. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

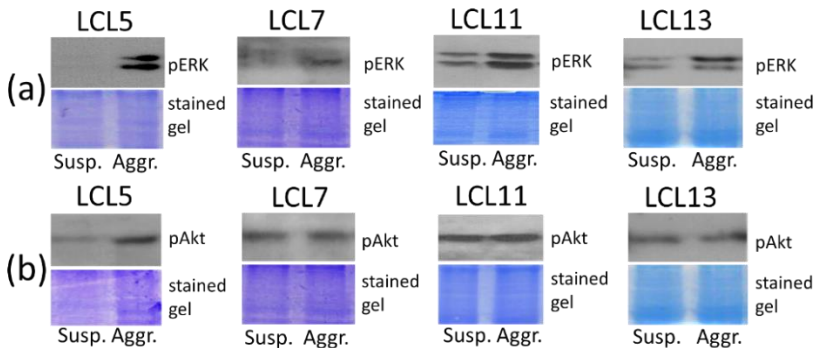


Fig. 7. (a) Phosphorylation of ERK1/2 in primary lung cancer cell lines tends to be higher in aggregated cells (cell-cell contacts) than in single cells in suspension (cells without contacts). (b) Phosphorylation of AKT in primary lung cancer cell lines do not differ significantly between the aggregated cells and single cells in suspension. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

The studies of extracellular contact-dependent phosphorylation of the kinase p38 showed that loss of focal adhesion activated MAPK p38 in both Myo and A549 cells. In the fractions of both suspension cells and aggregated cells phosphorylated p38 was increased compared to the control adherent cells (Fig. 8(a,b)). An increase in p38 phosphorylation was also observed during inhibition of cell-substrate-induced signaling using FAK inhibitor (Fig. 8(c)). Thus, our results show that stress kinase p38 is activated in lung cancer A549 and Myo stem cells during anoikis. However, treatment with SB203580 did not show a significant difference from the control (Fig. 8(d)). To date, we cannot conclude what role p38 plays in anoikis regulation in the cancer and stem cells studied.

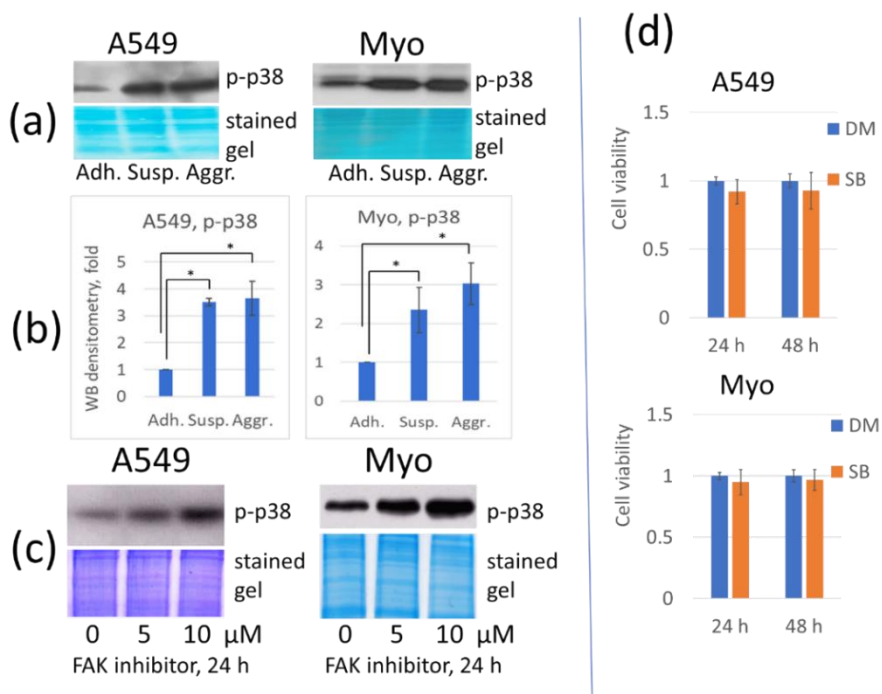


Fig. 8. MAP kinase p38 phosphorylation dependency on extracellular contacts. (a) Both A549 and Myo cells in suspension and in aggregates show higher p38 phosphorylation level than in adherent cells. (b) Densitometric quantification of phospho-p38 protein to assess differences between the adherent cells and cells in suspension and cells in aggregates. In four independent experiments performed under the same culture conditions, the intensity of the Western blot bands was normalized to the corresponding total protein in the same lanes. Statistical significance of the differences was calculated using paired two-tailed Student's t-test comparing Adh. to Susp. and Adh. to Aggr. and were found to be significant (N = 4, $p < 0.05$, marked

with asterisks). (c) FAK inhibitor PF573228 increases p38 phosphorylation in adherent cells. Adh. – adherent cells, Susp. – single cells in suspension, Aggr. – aggregated cells. (d) p38 kinase inhibitor SB203580 does not clarify the role of p38 in A549 or Myo cells during anoikis. Single cells in suspension were treated with 10 μ M of SB203580 (SB) or its solvent DMSO. Cell viability was measured by the resazurin reduction method after 24 and 48 h of treatment. DMSO-treated cell viability was normalized to 1.0. None of the differences was significant ($p > 0.05$, $N > 7$). (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

Using JNK specific inhibitor SP600125, we showed increased cell death under non-adherent conditions (Fig. 9(a)). In the study of JNK activation by the WB method using anti-double phospho-T183/Y185 JNK 1/2 antibody, we found that phosphorylation of JNK in detached cells was higher than in adherent cells (Fig. 9(b,c)). Furthermore, inhibition of kinase FAK in cells activated JNK phosphorylation (Fig. 9(d)). Therefore, anoikis is followed by increased phosphorylation of stress kinase JNK.

We further sought to clarify the dependence of transcription factor cJun, the major target of JNK, phosphorylation on cell extracellular contacts. Our data showed that cJun phosphorylation slightly increased in detached single cells with respect to adherent cells (Fig. 10(a)). A comparison of cJun phosphorylation in single cells in suspension and in cell aggregates, however, revealed the opposite result: aggregated cells had less phosphorylated cJun than single cells (Fig. 10).

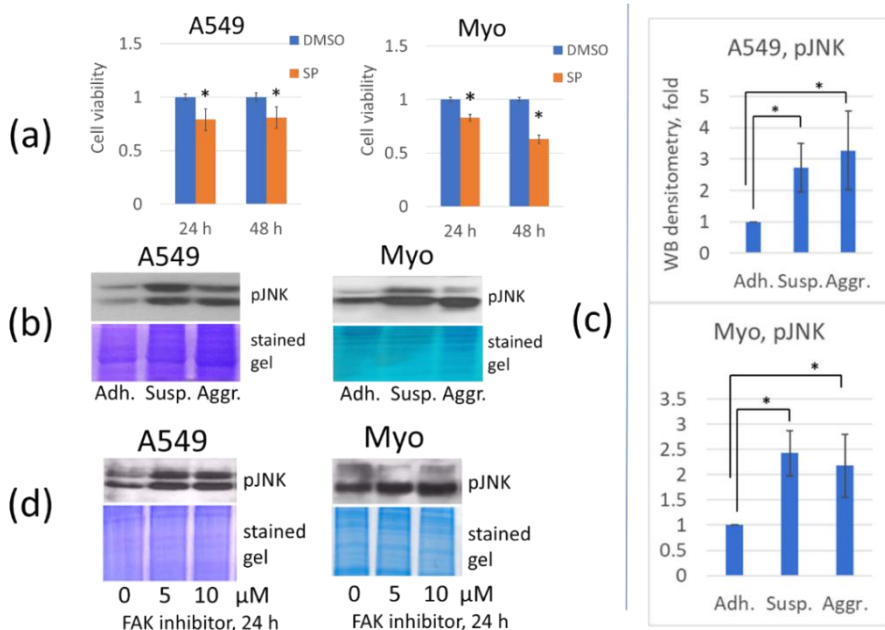


Fig. 9. MAP kinase JNK signaling dependency on extracellular contacts. (a) JNK inhibitor SP600125 (SP) decreases Myo and A549 cell survival in suspension. Single cells in suspension were treated with 20 μM of SP600125 or its solvent DMSO. Cell viability was measured by the resazurin reduction method after 24 and 48 h of treatment. DMSO-treated cell viability was normalized to 1.0. Asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$, $N = 3$). (b) Both A549 and Myo cells in suspension and in aggregates show higher JNK phosphorylation level than in adherent cells. (c) Densitometric quantification of phospho-JNK protein to assess differences between the adherent cells and cells in suspension and cells in aggregates. In four independent experiments performed under the same culture conditions, the intensity of the Western blot bands was normalized to the corresponding total protein in the same lanes. Statistical significance of the differences was calculated using paired two-tailed Student's t-test comparing Adh. to Susp. and Adh. to Aggr. and was found to be significant ($N = 4$, $p < 0.05$, marked with asterisks). (d) FAK inhibitor PF573228 increases JNK phosphorylation in adherent cells. Cells were lysed after 24 h of incubation. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

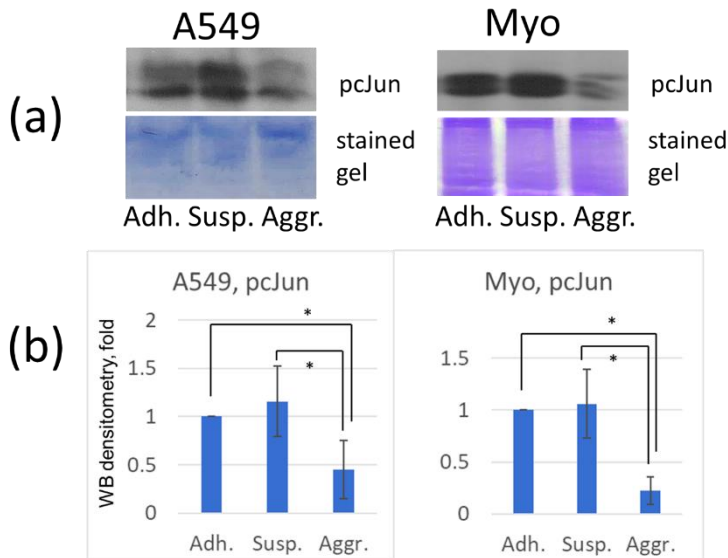


Fig. 10. *cJun* phosphorylation depends on extracellular contacts. (a) *cJun* phosphorylation at S63 in cells in aggregates is lower than in single cells in suspension or in cells adhered to the substratum in both A549 and Myo cells. Cells were lysed after 24 h of incubation. Representative Western blot images are shown. (b) Densitometric quantification of phospho-*cJun* protein to assess differences between the adherent and aggregated cells, and cells in suspension vs. aggregated cells. In four independent experiments performed under the same culture conditions, the intensity of the Western blot bands was normalized to the corresponding total protein in the same lanes. Statistical significance of the differences was calculated using paired two-tailed Student's *t*-test comparing Adh. to Aggr. and Susp. to Aggr. and was found to be significant ($N = 4$, $p < 0.05$, marked with asterisks. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

This suggests that intercellular contacts may inhibit *cJun* phosphorylation. Addressing this issue, we found that cell-cell contacts inhibited *cJun* protein expression in these cells. The inhibitory role of intercellular contacts on *cJun* protein level was confirmed in cells incubated in suspension in the absence of any interactions when compared to cells in aggregates (cell-cell interactions). Data presented in Fig. 11(a) show that cell-cell contacts in aggregates decrease the amount of *cJun* protein in both A549 and Myo cells.

Furthermore, the expression of the transcription factor *cJun* was higher in cells with lower culture density. A marked increase in *cJun* expression by reducing cell culture density from monolayer to sparse was shown in both

cancer and stem cell models used in our study (Fig. 11(b)). Therefore, the data obtained indicate the inhibitory role of cell-cell contacts on cJun protein level in a cell.

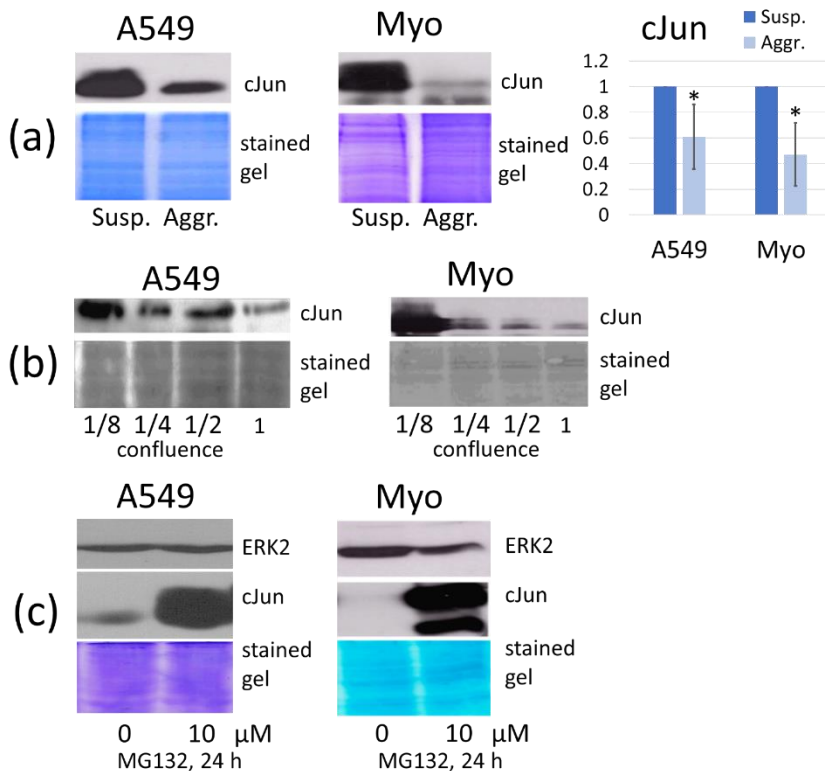


Fig. 11. *cJun* protein expression regulation by cellular contacts. (a), left. Intercellular contacts inhibit *cJun* protein expression in A549 and Myo cell aggregates. Aggregated cells (Aggr.) have less of *cJun* protein than single cells in suspension (Susp.). (a), right. Densitometrical quantification of *cJun* protein to assess differences between the cells in suspension and cells in aggregates. Western blot band intensities from four independent experiments have been normalized to the corresponding total protein content in the same lanes. Statistical significance of the difference was calculated using paired two-tailed Student's *t*-test comparing Aggr. to Susp. and was found to be significant ($p = 0.025$ for A549, and $p = 0.003$ for Myo cells). (b) The amount of *cJun* in cells decreases with increasing cell density. (c) Proteasome inhibitor MG132 in dense cell cultures significantly increases *cJun* protein level but not ERK2. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)

Data provided in Fig. 12 ((a) and (b)) show that phosphorylation of cJun decreased with increasing cell density in culture, whereas, conversely, phosphorylation of JNK increased. At the same time, the amount of JNK protein in the cells did not change. These studies indicate the opposite dependence of phospho-cJun and phospho-JNK changes on cell density. In summary, it can be argued that the significance of c-Jun N-terminal kinase activation in cells may depend on the amount of cJun in cells, which is determined by cell-cell contacts.

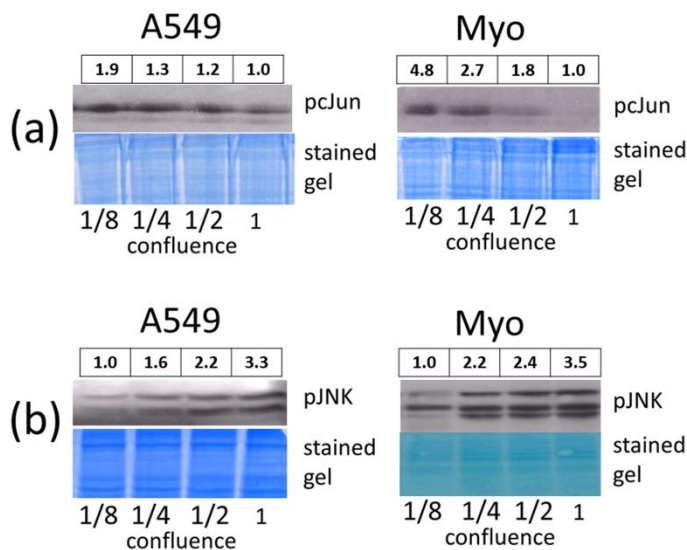


Fig. 12. *Opposite cJun and JNK phosphorylation as a function of cell density. (a) cJun phosphorylation decreases with increasing cell density in culture. (b) JNK phosphorylation increases with increasing cell density in culture. Representative Western blots are shown. Numbers above the blots indicate relative band intensity. Stained SDS-PAGE gels serve as loading controls. (© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved. doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110034.)*

Taken together, in this study, comparison of the phosphorylation profile of protein kinases in distinct cellular states – in detached, adherent, or aggregated cells – highlighted the importance of the extracellular contacts and showed differences between cell lines.

In general, it can be said that cell adhesion (either to other cells or to a substrate) is currently considered essential in deciding cell fate, beside the other well-known developmental signals. Consequently, the adhesion signal-transducing and cell fate-regulating protein kinases are greatly regulated by extracellular contacts and depend on the context in which the cells are present.

Therefore, the design of novel approaches to improve (in biomanufacturing industry) or impair (in cancer precision medicine) the anchorage-independent growth and survival of cells requires a better understanding of the signal transduction mechanisms in specific circumstances. Detailed studies are needed in each case to determine the molecular regulation of anoikis.

In the second experimental part, we examined the susceptibility of different lung cancer-derived cell lines to conventional chemotherapeutic drugs (cisplatin, paclitaxel, docetaxel) and protein kinase-targeted drugs (MEK inhibitor selumetinib, AKT inhibitor capivasertib, and other). As a result, differential drug sensitivity of the cell lines was confirmed by unequal response to conventional chemotherapeutic drug cisplatin and targeted drugs, directed at the molecules of ERK and AKT signaling pathways (Fig. 13). Viability tests presented in Figure 13, A, showed a nonuniform cisplatin concentration-dependent decrease in cell viability in different lung cancer-derived cell lines as determined after 72 hours of treatment. Intracellular kinase ERK and AKT-targeted drugs resulted in cell proliferation inhibition (Fig. 13, B), but had modest and different (among cell lines) effects on cisplatin-induced cell death when used alone (Fig. 13, C). Meanwhile, the combined activity of selumetinib and capivasertib led mostly to an increase in both anti-proliferative and pro-death responses, although again in a cell-line-dependent manner.

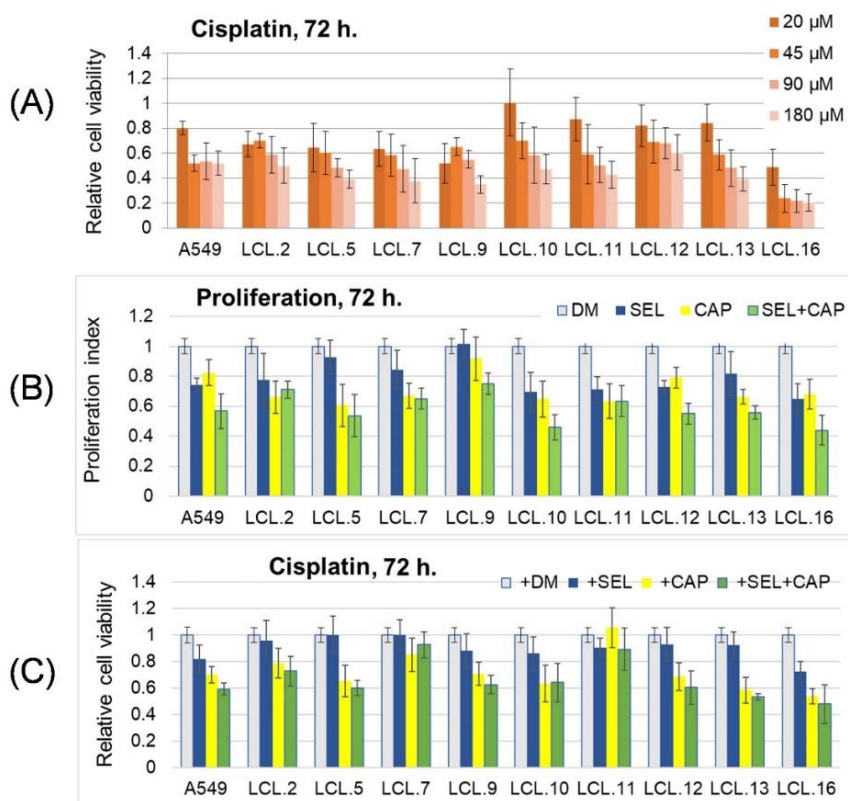


Fig. 13. Impact of cisplatin and targeted drugs on cell viability of different lung cancer-derived cell lines. (A) Lung cancer-derived cells respond differently to cisplatin. Cell viability was determined by MTT assay and expressed in relation to the viability before the treatment (relative cell viability of initial control = 1.0). DM – solvent DMSO. Data are expressed as means \pm SD, N = 4. (B) Targeted drugs inhibit cell proliferation. Proliferation without inhibitors is normalized to 1.0. (C) Lung cancer cells respond differently to combinations of targeted drugs and conventional drug cisplatin. Cell survival without inhibitors is normalized to 1.0. The concentrations of cisplatin that induced 50% of cell death after 72 h of treatment were used. DM – vehicle control (DMSO), SEL – selumetinib (10 μ M), CAP – capiwasertib (10 μ M).

(Copyright © 2023 Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521). The following figures are from an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this

journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms).

The cells were resistant to the drugs studied (note that the inhibitors of kinases alone did not induce cellular death although they slowed down the proliferation; similarly, the highest concentration of cisplatin did not kill more than 60% (on average) of the cells in 3 days). Nevertheless, cell behavior indicated that both ERK and AKT were involved in the regulation of cell proliferation and survival after treatments. To support this, the changes in the phosphorylation status of these protein kinases were studied after addition of cisplatin. WB analysis showed an increase in the phosphorylation of both kinases. As shown in Fig. 14, A, the treatment of A549 cells with cisplatin (90 μ M) resulted in a gradual and persistent increase in phosphorylation of ERK. Less noticeable changes in phosphorylation of AKT were observed. An increase in ERK and AKT phosphorylation was also shown in other cell lines, as presented in Fig. 14, B, after 6 hours of cellular exposure to cisplatin.

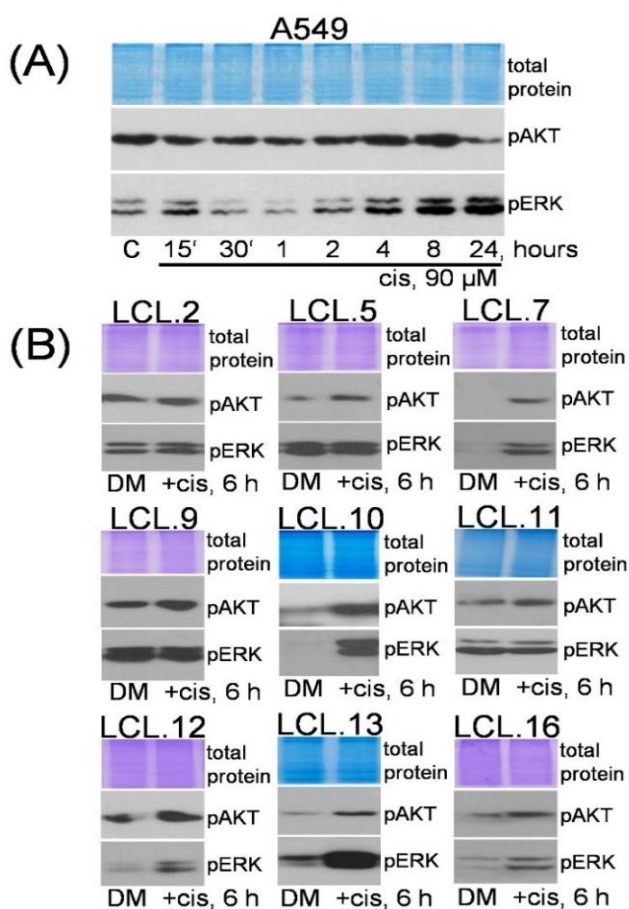


Fig. 14.
Phosphorylation of ERK1/2 and AKT in lung cancer-derived cell lines after cisplatin treatment. (A) The dynamics of AKT and ERK phosphorylation in A549 cells. (B) Changes in AKT and ERK phosphorylation in lung tumor-derived cell lines after 6 hours of cisplatin treatment. Representative Western blots are shown. Coomassie-

stained protein gels are presented as loading controls. The concentration of cisplatin was 90 μ M. (© 2023 Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521))

Further, the efficacy of the inhibitors used in our study was confirmed by reduced target phosphorylation in all tested cells. We would like to note that the AKT inhibitor capivasertib increased the phosphorylation of AKT itself at position Thr308, but at the same time it inhibited the phosphorylation of AKT downstream target GSK3 β (Fig. 15, A), thus confirming the inhibition of kinasic activity of AKT. Data on the increase in AKT phosphorylation upon exposure of cells to the capivasertib are also shown by other authors [15][16][17]. As shown in the Figure 15, B, incubation of cells with targeted drugs and inhibitors of AKT signaling (AKT kinase inhibitor VIII; idelalisib, an inhibitor of AKT upstream kinase PI3K), effectively decreased phosphorylation of AKT molecules in control and cisplatin-treated cells. At

the same time, inhibitors of ERK signaling (selumetinib and trametinib, inhibitors of ERK upstream kinases MEK1/2, and ERK inhibitor SCH772984) decreased phosphorylation of ERK (Fig. 15, C). Experiments confirmed that the used targeted drugs were effective in our cellular model system.

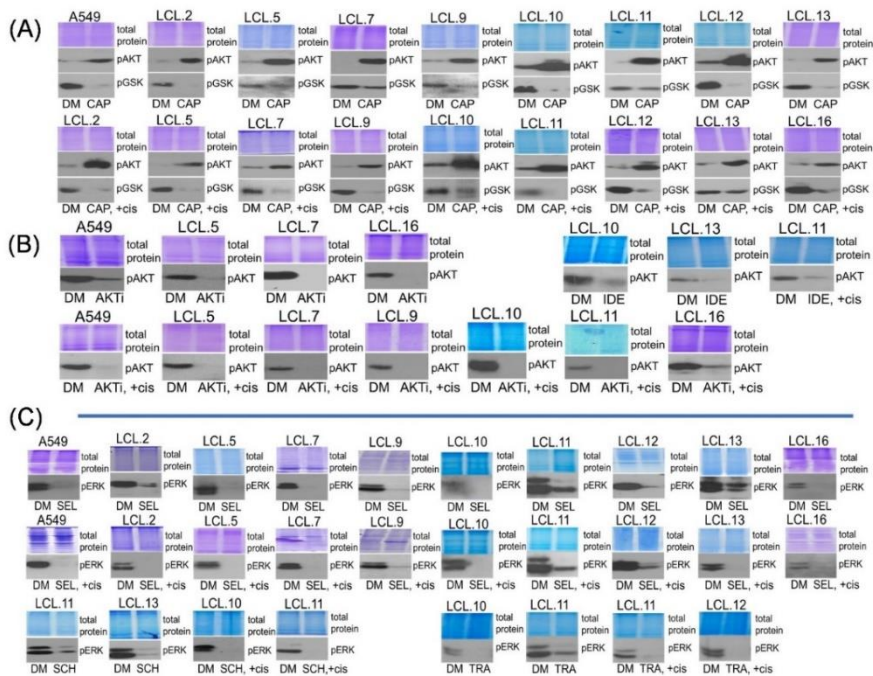


Fig. 15. Determining the efficacy of targeted drugs by phosphorylation of their targets. (A) Capiasertib, an AKT inhibitor, increases the phosphorylation of AKT itself. Capiasertib efficacy is demonstrated by inhibited phosphorylation of GSK3 β , a downstream target of AKT. DM – vehicle control (DMSO), CAP – capivasertib, +cis – cisplatin. (B) AKT inhibitor VIII (AKTi) and PI3K inhibitor idelalisib (IDE) reduce AKT phosphorylation in control and cisplatin-treated cells. (C) MEK/ERK signaling inhibitors suppress ERK1/2 phosphorylation in control and cisplatin-treated cells. SEL – selumetinib, SCH – ERK inhibitor SCH772984, TRA – trametinib. Representative Western blots are shown. 6-hour-long exposures to the drugs were used. The concentration of cisplatin was 90 μ M, and that of inhibitors was 10 μ M except for trametinib and SCH772984 (1 μ M). (© 2023 Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521))

In the second part of the work, activation of alternative kinases was investigated as a possible mechanism of resistance to targeted drugs. The phenomenon of crosstalk between PI3K/AKT and MEK/ERK pathways was analyzed by using inhibitors of molecules of these signaling pathways alone or in combination with cisplatin in a panel of lung cancer-derived primary cell lines.

Bearing in mind that *KRAS* status can determine feedback between PI3K/AKT and MEK/ERK pathways, in our work we used *KRAS*-mutant A549 cells (a continuous cell line) to compare the phenomenon of activation of alternative kinases with other cell types [18]. We tested cell lines obtained from lung tumors, albeit without genetic subtyping, and found that the phenomenon of crosstalk was common to all cell types studied. As shown in Figure 16, A, treatment of cells with the inhibitors of ERK signaling selumetinib, trametinib, and SCH772984 increased AKT phosphorylation both in control and cisplatin-treated cells. Conversely, inhibition of AKT signaling with capivasertib, idelalisib, and AKT inhibitor VIII increased ERK phosphorylation in all cell lines examined, again both in control and cisplatin-treated (Fig. 16, B). Thus, compensatory feedback loops between the two signaling pathways have been confirmed in the lung-derived cells: inhibition of ERK induced activation of AKT and vice versa: inhibition of AKT led to activation of ERK. It should also be mentioned that the feedback phenomenon between kinases has also been observed in our previous work on cells of non-human origin, namely, rabbit muscle-derived stem cells (data not presented). In addition, the inhibitors had negligible impact on total amounts of ERK2 and pan-AKT protein levels as determined by Western blot method.

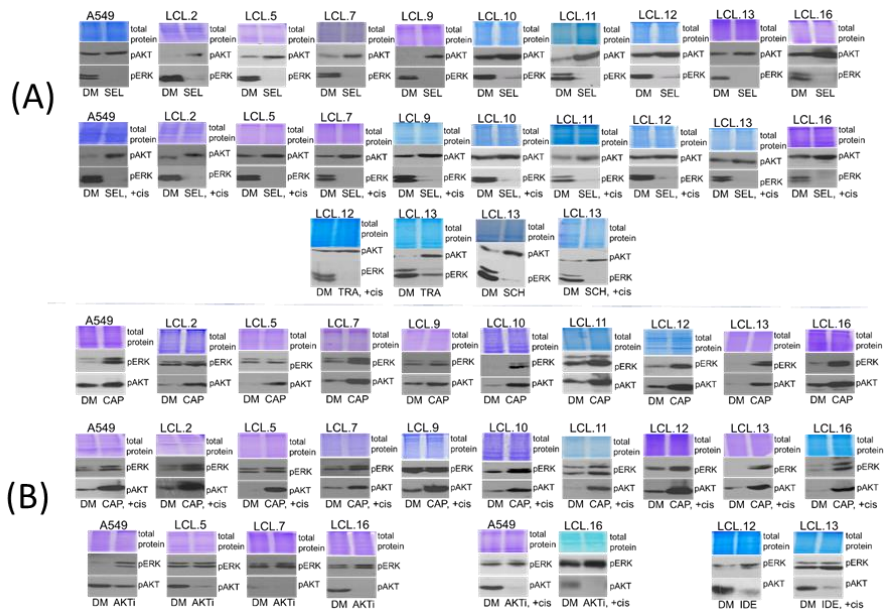


Fig. 16. Crosstalk with negative feedback between ERK and AKT signaling pathways in human lung cancer-derived cell lines. (A) MEK/ERK pathway inhibitors selumetinib, trametinib as well as ERK inhibitor SCH772984 enhance AKT phosphorylation in the cell lines tested, control and cisplatin-treated cells. (b) AKT inhibitor capivasertib, AKT inhibitor VIII and PI3K inhibitor idelalisib enhance ERK1/2 phosphorylation in control and cisplatin-treated cells. 6-hour-long exposures to the drugs were used. DM – vehicle control (DMSO), SEL – selumetinib (10 μ M), +cis – cisplatin (90 μ M), TRA – trametinib (1 μ M), SCH - SCH772984 (1 μ M), CAP – capivasertib (10 μ M), AKTi – AKT inhibitor VIII (10 μ M), IDE – idelalisib (10 μ M). (© 2023 Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaite, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521))

Our results presented in Figures 13-16 were performed with cells adhering to the extracellular substrate, and we further sought to elucidate how kinase interactions might be regulated in circulating cancer cells. In this study, still using adherent cell cultures, we observed that an inhibitor of focal adhesion kinase PF573228 attenuated AKT phosphorylation which was induced by MEK inhibitor selumetinib (Fig. 17, A). Similarly, AKT inhibitor capivasertib-induced increase in ERK phosphorylation was diminished by PF573228 in control and cisplatin-treated lung cancer-derived cells (Fig. 17, B). This suggested a possible role of cellular interactions with the substrate, in regulating the crosstalk between the signaling pathways.

It should be mentioned that we failed to obtain a decrease in AKT phosphorylation in A549 cells exposed to PF573228 and selumetinib simultaneously (Fig. 17, A). These data are consistent with our previously demonstrated role of FAK inhibition on ERK kinase in A549 cells: FAK inhibitor promoted ERK phosphorylation in A549 cells (Fig.5, C). Likewise, abnormal activation of ERK1/2 in lung cancer A549 cells, in contrast to downregulation in other cell lines studied, was determined in an anchorage-independent state (Fig. 5, D).

Lastly, to mimic the anchorage-independent state of circulating cancer cells, we incubated single cells of randomly selected lines in suspension without any cell-cell contacts as described in the Methods section and treated them with drugs. As we can see in Figure 17, C, the effect of inhibitors on the activation of alternative kinases, showing crosstalk between kinases, was attenuated in cells in suspension. This phenomenon has been confirmed for both selumetinib and AKT inhibitor VIII. No increase in AKT or ERK phosphorylation following ERK or AKT inhibition, respectively, was detected in the non-adherent cell model. Thus, the loss of extracellular contacts may eliminate kinase interactions.

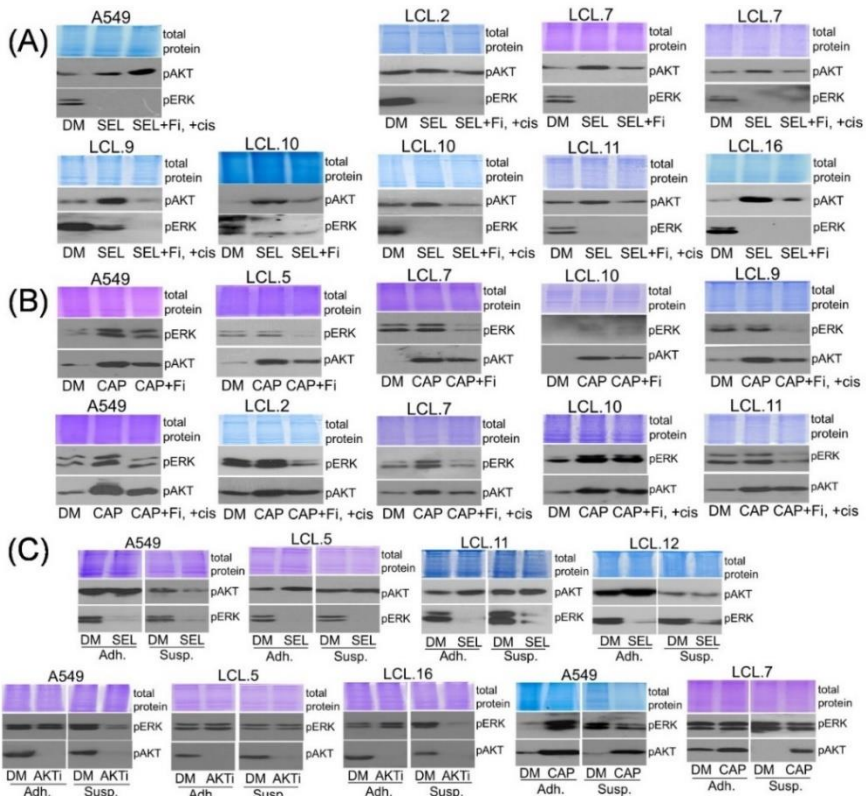


Fig. 17. Dependence of the interplay between ERK and AKT signaling pathways on extracellular contacts. (A) Focal adhesion kinase inhibitor PF573228 (+Fi; 10 μ M) attenuates the MEK kinase inhibitor selumetinib-induced increase of AKT phosphorylation in control and cisplatin-treated lung cancer-derived cells, except A549 cells. (B) PF573228 prevents the AKT inhibitor capivasertib-induced increase in ERK phosphorylation in control and cisplatin-treated lung cancer-derived cells. (C) Cells grown in suspension (Susp) under agitation, in contrast to adherent cells (Adh), do not show alternative kinase activation. 6-hour-long exposures to the drugs were used. DM – vehicle control (DMSO), SEL – selumetinib (10 μ M), +cis – cisplatin (90 μ M), CAP – capivasertib (10 μ M), AKTi – AKT inhibitor VIII (10 μ M). (© 2023 Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521))

In addition, in this study, we found that interaction between the kinases may be dependent on the strength of the chemotherapeutic stimulus: no crosstalk between AKT and ERK1/2 was observed in cells exposed to a high

concentration (240 μM) of cisplatin (Fig. 18). The latter finding might support the idea of high-concentration intra-tumoral chemotherapy [19].

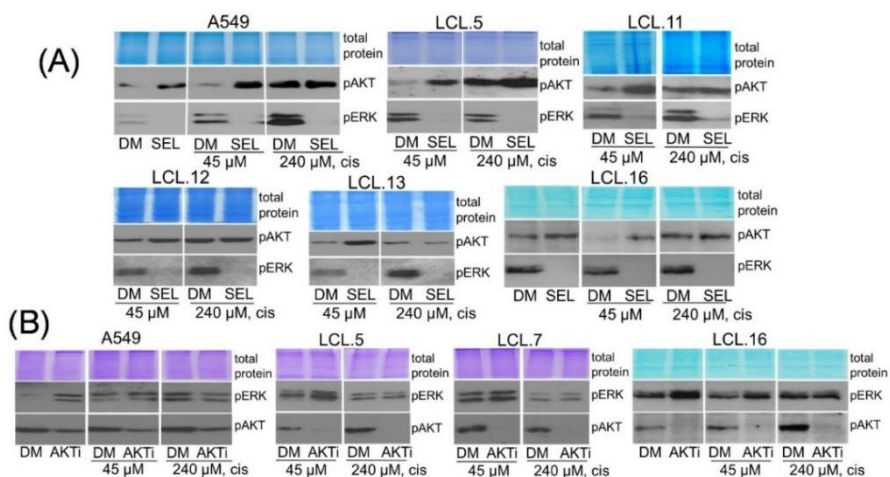


Fig. 18. ERK and AKT crosstalk might be signal strength-dependent. Cells pretreated with a high concentration of cisplatin (240 μM) do not show alternative kinase AKT activation in response to ERK inhibition by selumetinib (A), nor ERK activation in response to AKT inhibitor VIII, contrary to untreated or low cisplatin concentration (45 μM)-treated cells (B). 6-hour-long exposures to the drugs were used. DM – vehicle control (DMSO), SEL – selumetinib (10 μM), +cis – cisplatin (90 μM), AKTi – AKT inhibitor VIII (10 μM). (© 2023 Stulpinas, Sereika, Vitkeviciene, Imbrasaitė, Krestnikova and Kalvelyte. doi: [10.3389/fonc.2022.1045521](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1045521))

The phenomenon of crosstalk between kinases ERK1/2 and AKT was demonstrated with all different targeted drugs (kinase inhibitors) used in our study and was evidenced in all cell lines tested, regardless of genotype and phenotype differences. In addition, based on the obtained data, it can be stated that the intensity of drug-induced signaling as well as signals induced by extracellular contacts may be involved in the interplay between kinases. Summing up, the ERK-AKT crosstalk regulating mechanism and the methodology that we used to investigate it can be represented in the following diagram (Fig. 19).

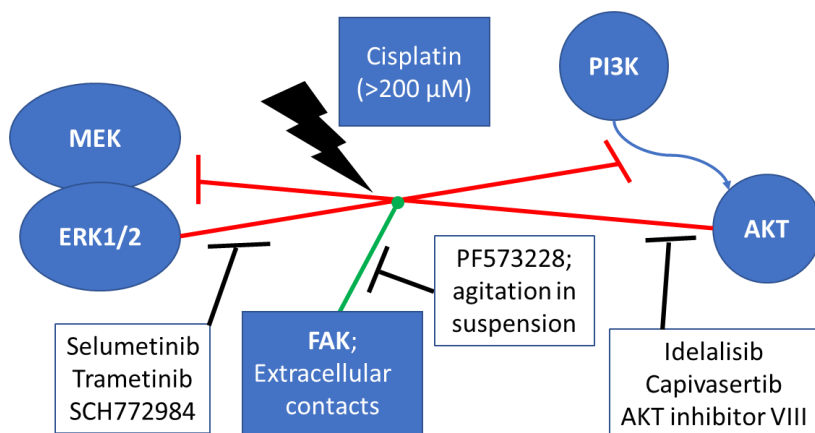


Fig. 19. ERK-AKT crosstalk regulating mechanism and the methodology that was used to investigate it. Red lines – inhibition; green line – stimulation.

DISCUSSION

Although cancer is caused by genetic mutations, there is growing evidence that non-genetic mechanisms lead to drug resistance. There is no doubt that identification of genetic tumor signatures is of great importance for cancer treatment, however, now it is well known that non-genetic modulation of the cellular state can strongly influence drug responses, conferring resistance to both conventional cytotoxic and targeted drugs.

The basal activity of signaling molecules is an important factor that determines the behavior of a cell under different circumstances. Its variation can lead to different responses under changing conditions. One of the possible causes of cancer resistance and relapse is the circulating tumor cells which are a way different from those that remain adherent in a solid tumor.

A relevant area from a clinical point of view of this aspect is the importance of extracellular contacts in circulating cancer cells, either single cells or groups of cells. Tumor cells often lose interaction with the substrate. Although circulating tumor cell clusters were described long ago, only now are they being addressed as key players in metastatic dissemination. Tumor cell aggregates, homotypic monoclonal or polyclonal, detached from the primary tumor site, form metastases at distant sites from the original tumor, after travelling as cell clusters. Mounting evidence suggests that circulating tumor cell clusters, maintaining cell-cell adhesion, better resist anoikis than single cells [20]. This might be due to the overexpression of antiapoptotic genes as well as decreased expression of proapoptotic ones. In that respect,

undoubtedly, the molecular characterization and comparison of individual cells vs. cell clusters is of great clinical importance.

A variety of non-genetic mechanisms of cell resistance influencing drug responses have been described in many cancers. Usually, phenotype switching, cell dynamic state, and extracellular contacts, along with the identification of molecular mechanisms, are assessed during the evaluation of drug effectiveness [21]. We rely on the opinion that cell state-specific therapy is one of the essential approaches in modern cancer treatment [22], where cell fate may be determined by the activity of MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways, influenced by cell-specific intrinsic and extrinsic sources. The efficacy of targeted therapies against these signaling pathways, however, is limited due to the acquisition of non-genetic adaptive resistance by tumor cells. Therefore, the combination of specific signaling pathway-targeted drugs provides new treatment strategies [23].

Assessment of the influence of extracellular contacts on the activation/deactivation of cell fate-regulating kinases is important in predicting cell behavior and in determining normal and cancer cell response to treatment, depending on their phenotypic status as well as their location in the body. Our study showed that cells that had lost contact with the substrate activated phosphorylation of MAP kinases JNK and p38 and inactivated the phosphorylation of survival kinase AKT in A549 cancer cells and Myo stem cells by processes involving tyrosine kinase FAK. Notably, in accordance with the studies of other authors, the total level of AKT and MAPKs did not change during the processes studied. However, MAP kinase ERK phosphorylation in Myo and A549 cells was affected in different ways. Cell-substrate contact deprivation induced an increase in ERK phosphorylation in A549 cells but decreased in Myo cells. In this case, differences in kinase phosphorylation upon cell detachment from substrate were determined by events downstream of FAK activation since inhibition of this kinase alone had the same consequences as deprivation of cell adhesion.

To continue with MAPK ERK, it needs to be mentioned that the maintenance of adhesion in cell aggregates through cell-cell contacts conferred resistance to anoikis. Increased ERK activation in aggregates when compared to cells in suspension confirmed the antiapoptotic role of ERK in our models of detached cells. Our studies have shown, however, that cell-substratum contacts affect ERK activation differently in A549 lung cancer and Myo stem cells, suggesting that different approaches are needed for targeting prosurvival kinase ERK during anoikis in diverse cells. Cell-substrate contact-

independent ERK activation in cancer cells may be responsible for their resistance to anoikis and ability to metastasize.

Taken together, in this study, comparison of the phosphorylation profile of protein kinases in distinct cellular states – in detached, adherent, or aggregated cells – highlighted the importance of the extracellular environment and showed differences between cell lines. In general, it can be said that cell adhesion (either to other cells or to a substrate) is currently considered essential in deciding cell fate, beside the other well-known developmental signals. Consequently, the adhesion signal-transducing and cell fate-regulating protein kinases are greatly regulated by extracellular contacts and depend on the context in which the cells are present. Therefore, the design of novel approaches to improve (in biomanufacturing industry) or impair (in cancer precision medicine) the anchorage-independent growth and survival of cells requires a better understanding of the signal transduction mechanisms in specific circumstances. Detailed studies are needed in each case to determine the molecular regulation of anoikis.

The interaction between signaling pathways has been shown for various and different cellular models. However, the prevailing view is that feedback between the AKT and ERK pathways is cell line-specific and depends on specific oncogenic mutations in cancer cells. In our work, on the contrary, the crosstalking of both signaling pathways was shown to be common to all cell types (at least to the ones we have examined) – inhibition of the PI3K/AKT pathway led to activation of the MAP kinase ERK and, conversely, inhibition of the MEK/ERK pathway increased phosphorylated AKT levels both in control cells, and in cells exposed to the chemotherapeutic drug cisplatin.

Given that non-genetic modulation of cell state can strongly affect cell signaling, including interactions between signaling pathways, and that cell state dictates drug sensitivity, we studied the interaction between AKT and ERK signaling molecules in cells that lose contact with the substrate. Circulating tumor cells, key players in metastatic dissemination, may respond differently to anticancer drugs than cells adherent to the extracellular substrate. Activation of MAP and AKT kinase cascades is known to involve regulatory events initiated by extracellular contacts through activation of integrins and downstream focal adhesion kinase FAK. Downstream of the integrin and growth factor receptors, FAK activates multiple targets, including AKT. As a part of the results, above it is shown that FAK is involved in the transmission of integrin-induced signaling to ERK and AKT in muscle stem cells and lung cancer cells.

Indeed, studies using a focal adhesion kinase inhibitor, as well as comparing substrate-attached cells with cells in suspension, have shown that

loss of extracellular contacts can abrogate compensatory interactions between these signaling pathways.

Thus, we have demonstrated the dependence of interactions between ERK and AKT protein kinases on the cellular state. Studies indicate that circulating cells may respond differently to anticancer drugs than cells that encounter other cells or the extracellular substrate. It follows that understanding the signaling events underlying the response of circulating tumor cells to anticancer drugs may lead to new approaches to overcoming the resistance of metastasizing cells to therapy, which unfortunately is a major shortcoming in cancer treatment.

In addition, our work demonstrated that signaling crosstalk was dependent on the relative strength of the inducer, with no cross-inhibition of the opposite kinase observed at high concentrations of cisplatin in different cells.

Current evidence clearly indicates that the MAPK and AKT signaling pathways are the most prominent clinically used targets in targeted cancer therapy [24][25]. Various pharmacological agents targeting the RAS/MEK/ERK and PI3K/AKT pathways have been developed and are being investigated in preclinical and clinical trials; unfortunately, limited antitumor activity mainly due to compensatory activation of these key intracellular signaling pathways is one of the major obstacles to their use.

MAPK inhibitors are being extensively evaluated in non-small cell lung cancer patients [26]. Studies conducted in Canada have shown that selumetinib, at the determined dose, can be safely combined with paclitaxel and carboplatin or pemetrexed and cisplatin in patients with advanced or metastatic NSCLC [27]. However, there is disappointing data from the phase III trial in which selumetinib+docetaxel in patients with advanced *KRAS*-mutant lung cancer did not improve overall survival [28]. Similarly, selumetinib+gemcitabine regimens have not been tolerated during the SELECT-3 clinical trial. In summary, it should be said that studies utilizing this drug as monotherapy did not confirm its efficacy for NSCLC [29].

The PI3K/AKT/mTOR pathway is also a promising target for the treatment of solid cancers. The AKT signaling is constitutively active in non-small cell lung cancer cells [30]. More than 50 compounds targeting key components of the PI3K/AKT/mTOR signaling network are in development. Many of them have been tested in clinical trials involving patients with a range of different cancers as this pathway is dysregulated almost in all human cancers, including breast cancer, colorectal cancer, lung and hematologic malignancies, etc. Although the mTOR inhibitors temsirolimus and

everolimus and the PI3K inhibitors idelalisib and copanlisib have been approved by the FDA for clinical use in the treatment of some different cancers, clinical data indicated that the use of single-agent PI3K pathway inhibitors achieved modest responses and was unlikely to be a curative therapy for diverse cancers [31].

Studies of cross-talks between PI3K signaling and other pathways are thought will guide future combination strategies of using clinically relevant inhibitors in various tumor types [32]. Overall, the available evidence suggests that drug resistance (intrinsic or acquired) to such targeted therapies results at least in part from negative feedback interactions between these kinases, combined with tumor heterogeneity, cellular state, mutational background, etc. Therefore, combinations of inhibitors are preferred for cancer treatment (rather than monotherapy) that target different kinases alone or in combination with chemotherapy and/or immunotherapy [33].

Based on our studies, it can be concluded that the usefulness of a combination of kinase inhibitors should be evaluated for each cancer subtype based on the pattern of MEK/ERK and PI3K/AKT signaling. It appears that cancer cells entering the bloodstream, when compared to the cells within a solid tumor, should respond differently to targeted drugs due to differences in regulation. Further studies are needed to be directed at a more detailed understanding of the molecular mechanisms governing the feedback regulation of protein kinases ERK and AKT in different cellular states and at different inducer concentrations.

CONCLUSIONS

1. **Regardless of cell origin or cell type, the basal phosphorylation levels of the protein kinases MAPK and AKT are dependent on extracellular contacts, albeit differently for individual kinases.** ERK, JNK and AKT kinases protect cells from anoikis when cells lose contact with the surface.

2. **Phosphorylation and expression of molecules of the same signaling pathway – JNK and the transcription factor cJun – are differentially affected by intercellular contacts.** cJun expression and phosphorylation decrease while JNK phosphorylation increases with 2D cell culture confluence.

3. **The effect of targeted drugs and their combinations with the conventional drug cisplatin varies between lung cancer-derived cell lines in terms of both cell proliferation and cell death.** Cells of lung cancer origin have active ERK1/2 and AKT kinases. Targeted drugs aimed at molecules of

the MAPK ERK and AKT signaling pathways effectively inhibit phosphorylation of their targets in all cell lines studied.

4. **In lung cancer-derived cell lines there are compensatory feedback loops between two signaling pathways:** inhibition of the PI3K/AKT pathway promotes the activation of the MAP kinase ERK and, conversely, inhibition of the MEK/ERK pathway increases the level of phospho-AKT. The phenomenon is characteristic of all cell lines studied, regardless of genotype/phenotype differences, both in control and cisplatin-treated cells, using different inhibitors of these kinases.

5. **Interaction between the ERK and AKT signaling pathways is dependent on extracellular contacts.** Crosstalk is decreased in detached cells, as well as by inhibition of FAK (focal adhesion kinase) with its inhibitor PF573228. Negative feedback between the kinases may **depend on the strength of the chemotherapeutic stimulus.**

REFERENCES

- [1] B. Ke, M. Tian, J. Li, B. Liu, and G. He, "Targeting Programmed Cell Death Using Small-Molecule Compounds to Improve Potential Cancer Therapy," *Medicinal Research Reviews*. 2016. doi: 10.1002/med.21398.
- [2] N. Niu and L. Wang, "In vitro human cell line models to predict clinical response to anticancer drugs," *Pharmacogenomics*, vol. 16, no. 3, pp. 273–285, Mar. 2015, doi: 10.2217/pgs.14.170.
- [3] C. Sonnenschein and A. M. Soto, "The Death of the Cancer Cell," *Cancer Res*, vol. 71, no. 13, pp. 4334–4337, Jul. 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0639.
- [4] A. V. Kalvelytė, A. Imbrasaitė, N. Krestnikova, and A. Stulpinas, "Adult Stem Cells and Anticancer Therapy," in *Advances in Molecular Toxicology*, 2017, pp. 123–202. doi: 10.1016/B978-0-12-812522-9.00004-X.
- [5] F. Iorio *et al.*, "A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer," *Cell*, vol. 166, no. 3, pp. 740–754, Jul. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.017.
- [6] J. Kajstura *et al.*, "Evidence for Human Lung Stem Cells," *New England Journal of Medicine*, vol. 364, no. 19, pp. 1795–1806, 2011, doi: 10.1056/nejmoa1101324.
- [7] A. Eramo, T. L. Haas, and R. De Maria, "Lung cancer stem cells: Tools and targets to fight lung cancer," *Oncogene*, vol. 29, no. 33, pp. 4625–4635, Aug. 2010, doi: 10.1038/onc.2010.207.
- [8] Q. Guo *et al.*, "Current treatments for non-small cell lung cancer," 2022, doi: 10.3389/fonc.2022.945102.

- [9] M. Shanker, D. Willcutts, J. A. Roth, and R. Ramesh, "Drug resistance in lung cancer," *Lung Cancer: Targets and Therapy*, vol. 1, pp. 23–36, May 2010, doi: 10.2147/lctt.s6861.
- [10] E. D. Jong, I. C. W. Chan, and A. M. Nedelcu, "A Model-System to Address the Impact of Phenotypic Heterogeneity and Plasticity on the Development of Cancer Therapies," *Front Oncol*, vol. 9, Aug. 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00842.
- [11] A. S. Jain *et al.*, "Everything Old Is New Again: Drug Repurposing Approach for Non-Small Cell Lung Cancer Targeting MAPK Signaling Pathway," *Front Oncol*, vol. 11, Oct. 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.741326.
- [12] L. Zhong *et al.*, "Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives," *Signal Transduct Target Ther*, vol. 6, no. 1, p. 201, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00572-w.
- [13] S. Mercille and B. Massie, "Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells," *Biotechnol Bioeng*, vol. 44, no. 9, pp. 1140–1154, Nov. 1994, doi: 10.1002/bit.260440916.
- [14] A. Kalvelyte *et al.*, "Long-term muscle-derived cell culture: multipotency and susceptibility to cell death stimuli," *Cell Biol Int*, vol. 37, no. 4, pp. 292–304, Apr. 2013, doi: 10.1002/cbin.10036.
- [15] Y. ZHANG *et al.*, "A novel AKT inhibitor, AZD5363, inhibits phosphorylation of AKT downstream molecules, and activates phosphorylation of mTOR and SMG-1 dependent on the liver cancer cell type," *Oncol Lett*, vol. 11, no. 3, pp. 1685–1692, Mar. 2016, doi: 10.3892/ol.2016.4111.
- [16] A. R. Choi, J. H. Kim, Y. H. Woo, J. H. Cheon, H. S. Kim, and S. Yoon, "Co-treatment of LY294002 or MK-2206 with AZD5363 attenuates AZD5363-induced increase in the level of phosphorylated AKT," *Anticancer Res*, vol. 36, no. 11, pp. 5849–5858, 2016, doi: 10.21873/anticancer.11170.
- [17] B. R. Davies *et al.*, "Preclinical Pharmacology of AZD5363, an Inhibitor of AKT: Pharmacodynamics, Antitumor Activity, and Correlation of Monotherapy Activity with Genetic Background," *Mol Cancer Ther*, vol. 11, no. 4, pp. 873–887, Apr. 2012, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0824-T.
- [18] H.-F. F. Yuen *et al.*, "Impact of oncogenic driver mutations on feedback between the PI3K and MEK pathways in cancer cells," *Biosci Rep*, vol. 32, no. 4, pp. 413–422, Aug. 2012, doi: 10.1042/BSR20120050.
- [19] W. Jiang *et al.*, "Bronchoscopic intratumoral injections of cisplatin and endostar as concomitants of standard chemotherapy to treat malignant central airway obstruction," *Postgrad Med J*, p. postgradmedj-2020-138823, Oct. 2020, doi: 10.1136/postgradmedj-2020-138823.

- [20] S. Amintas *et al.*, “Circulating tumor cell clusters: United we stand divided we fall,” *Int J Mol Sci*, 2020, doi: 10.3390/ijms21072653.
- [21] A. Stulpinas, M. Sereika, A. Vitkeviciene, A. Imbrasaitė, N. Krestnikova, and A. V. Kalvelyte, “Crosstalk between protein kinases AKT and ERK1/2 in human lung tumor-derived cell models,” *Frontiers in Oncology*, vol. 12, Jan. 2023, doi: 10.3389/fonc.2022.1045521.
- [22] W. C. Hahn *et al.*, “An expanded universe of cancer targets,” *Cell*, vol. 184, no. 5, pp. 1142–1155, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.02.020.
- [23] C. Grandori and C. J. Kemp, “Personalized Cancer Models for Target Discovery and Precision Medicine,” *Trends Cancer*, vol. 4, no. 9, pp. 634–642, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.trecan.2018.07.005.
- [24] S. Lee, J. Rauch, and W. Kolch, “Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 3, p. 1102, Feb. 2020, doi: 10.3390/ijms21031102.
- [25] M. Najafi, A. Ahmadi, and K. Mortezaee, “Extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling as a target for cancer therapy: an updated review,” *Cell Biol Int*, vol. 43, no. 11, pp. 1206–1222, Nov. 2019, doi: 10.1002/cbin.11187.
- [26] A. S. Jain *et al.*, “Everything Old Is New Again: Drug Repurposing Approach for Non-Small Cell Lung Cancer Targeting MAPK Signaling Pathway,” *Front Oncol*, vol. 11, no. October, pp. 1–15, 2021, doi: 10.3389/fonc.2021.741326.
- [27] J. R. Goffin *et al.*, “Canadian Cancer Trials Group (CCTG) IND215: A phase Ib study of Selumetinib in patients with untreated advanced or metastatic NSCLC who are receiving standard chemotherapy regimens,” *Invest New Drugs*, vol. 37, no. 3, pp. 498–506, Jun. 2019, doi: 10.1007/s10637-018-0680-z.
- [28] F. Casaluca, A. Sgambato, P. Maione, P. C. Sacco, G. Santabarbara, and C. Gridelli, “Selumetinib for the treatment of non-small cell lung cancer,” *Expert Opin Investig Drugs*, vol. 26, no. 8, pp. 973–984, 2017, doi: 10.1080/13543784.2017.1351543.
- [29] E. N. Imyanitov, E. V. Levchenko, E. S. Kuligina, and S. V. Orlov, “Treating non-small cell lung cancer with selumetinib: an up-to-date drug evaluation,” *Expert Opin Pharmacother*, vol. 21, no. 16, pp. 1943–1953, 2020, doi: 10.1080/14656566.2020.1798930.
- [30] A. C. Tan, “Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC),” *Thorac Cancer*, vol. 11, no. 3, pp. 511–518, Mar. 2020, doi: 10.1111/1759-7714.13328.

- [31] F. Janku, T. A. Yap, and F. Meric-Bernstam, “Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 15, no. 5, pp. 273–291, 2018, doi: 10.1038/nrclinonc.2018.28.
- [32] N. Vasan and L. C. Cantley, “At a crossroads: how to translate the roles of PI3K in oncogenic and metabolic signalling into improvements in cancer therapy,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 19, no. 7, pp. 471–485, Jul. 2022, doi: 10.1038/s41571-022-00633-1.
- [33] H. Sato *et al.*, “Combined inhibition of MEK and PI3K pathways overcomes acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer,” *Cancer Sci*, vol. 109, no. 10, pp. 3183–3196, Oct. 2018, doi: 10.1111/cas.13763.

PADĖKA

Tyrimai disertacijos tema buvo finansuoti Lietuvos mokslo tarybos konkursinio finansavimo priemonėmis (grantai Nr. LIG-10034 ir 01.2.2-LMT-K-718-01-0072), už ką esu dėkingas projektų ir disertacinio darbo vadovei dr. Audronei V. Kalvelytei. Dėkoju už doktorantūros krepšėlį ir stipendiją Švietimo, mokslo (ir sporto) ministerijai bei Vilniaus universitetui. Dėkoju už vardinę stipendiją Gyvybės mokslų centrui, taip pat už LMT paramą doktorantams (už akademinį pasiekimą). Dėkoju bendradarbiams ir publikacijų bendraautoriams už pagalbą, bendradarbiavimą ir toleranciją, Audronei Kalvelytei – dar ir už motyvaciją. Atskira padėka dr. Aušrai Ungurytei, dr. Gražinai Treigytei ir dr. Jūratei Savickienei. Disertacijos rankraščio recenzentų pastabos ir pasiūlymai buvo labai vertingi, ir ženkliai prisidėjo prie galutinio varianto formos ir turinio, už ką nuoširdus ačiū. Ypatingai dėkoju savo šeimai už supratingumą, atlaidumą ir palaikymą.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

- **Aurimas Stulpinas**, Matas Sereika, Aida Vitkeviciene, Ausra Imbrasaitė, Natalija Krestnikova, Audrone Valerija Kalvelyte. Crosstalk between protein kinases AKT and ERK1/2 in human lung tumor-derived cell models. *Frontiers in Oncology – Cancer Molecular Targets and Therapeutics*, 2023; 12:1045521. DOI: 10.3389/fonc.2022.1045521. IF 2021 – 5.74.
- **Stulpinas A**, Uzusienis T, Imbrasaitė A, Krestnikova N, Unguryte A, Kalvelyte A V. Cell-cell and cell-substratum contacts in the regulation of MAPK and AKT signalling: Importance in therapy, biopharmacy and bioproduction. *Cellular Signalling* 2021 Aug; 84:110034. DOI: 10.1016/j.cellsig.2021.110034. Impact factor (IF) 2021 – 3.97.
- **Stulpinas, A.**, Imbrasaitė, A., Krestnikova, Kalvelytė, A.V. Chapter 7: Recent Approaches Encompassing the Phenotypic Cell Heterogeneity for Anticancer Drug Efficacy Evaluation. In *Tumor Progression and Metastasis* / Edited by: Ahmed Lasfar and Karine Cohen-Solal. London: IntechOpen, 2020. ISBN: 978-1-78985-350-6. p.147-194. DOI: 10.5772/intechopen.89395.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.