

**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

**DOMINYKA BREIMELYTĖ**

**Genų raiškos pokyčiai skirtingo piktybiškumo krūties navikinėse ląstelių linijose po  
poveikio si-KRAS arba anti-EGFR**

**Magistro baigiamasis darbas**

Genetikos studijų programa

**Darbo vadovas**

Dr. Daiva Dabkevičienė

**Darbo konsultantas**

Monika Grubliauskaitė

Vilnius 2023

## TURINYS

<b>TURINYS</b>	<b>2</b>
<b>SANTRUMPOS</b>	<b>4</b>
<b>SANTRAUKA</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>7</b>
<b>IVADAS</b>	<b>8</b>
<b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b>	<b>10</b>
1.1 KRŪTIES NAVIKAI IR JŲ MIKROAPLINKA	10
1.2 KRŪTIES NAVIKŲ PATOLOGIJA	13
1.3 KRŪTIES NAVIKŲ ONKOPROTEINŲ DUALIŠKUMAS VĖŽIO GENETIKOJE	14
1.4 RAS ONKOPROTEINAI IR ERK/PI3K SIGNALINIŲ KELIŲ SAŠAJA	15
1.5 KRAS VAIDMUO ONKOGENEZĖJE	18
1.6 EGFR IR KRAS DUALIŠKUMAS KRŪTIES NAVIKŲ KONTEKSTE	19
1.7 ŠIUOLAIKINIAI GENETINIAI SLOPINIMO BŪDAI IR PRAKTIKA	21
<b>2. MEDŽIAGOS IR METODAI</b>	<b>25</b>
2.1 MEDŽIAGOS	25
2.2 METODAI	27
2.2.1 LĄSTELIŲ KULTIVAVIMAS IR KULTŪROS	27
2.2.2 LĄSTELIŲ ATŠILDYMAS	27
2.2.3 LĄSTELIŲ UŽŠALDYMAS	27
2.2.4 REAGENTŲ CITOTOKSIŠKUMO NUSTATYMAS	27
2.2.5 LĄSTELIŲ TRANSFEKCIJA SI-RNR	28
2.2.6 LĄSTELIŲ KULTŪRŲ MIGRACIJOS TYRIMAS	29
2.2.7 VISUMINĖS RNR IŠSKYRIMAS BEI KOKYBINIS IR KIEKYBINIS ĮVERTINIMAS	29
2.2.8 KOPIJINĖS DNR GENERAVIMAS, AMPLIFIKACIJA IR REALAUS LAIKO PGR	30
2.2.9 STATISTINĖ ANALIZĖ IR SKAIČIAVIMAI	32
<b>3. REZULTATAI</b>	<b>33</b>

<b>3.1</b>	<b>LĄSTELIŲ KULTŪRŲ GYVYBINGUMO TYRIMAS</b>	<b>33</b>
<b>3.2</b>	<b>LĄSTELIŲ MIGRACIJOS TYRIMAS</b>	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>GENŲ RAIŠKOS POKYČIAI PO POVEIKIO SIRNR-KRAS-A, SIRNR-KRAS-B BEI ANTI-EGFR</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>GENŲ SĄVEIKOS TINKLO ANALIZĖ, NAUDOJANT STRING DUOMENŲ BAZĖ</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b><u>REZULTATŲ APITARIMAS</u></b>	<b><u>47</u></b>
<b>4.1</b>	<b>CITOTOKSIŠKUMO ĮVERTINIMAS</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>MIGRACIJOS POKYTIS, VEIKIANT SIRNR ARBA ANTI-EGFR</b>	<b>47</b>
<b>4.3</b>	<b>GENŲ RAIŠKA PO SIRNR ARBA ANTI-EGFR</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>GENŲ SĄVEIKOS TINKLO ANALIZĖ</b>	<b>50</b>
	<b><u>IŠVADOS</u></b>	<b><u>51</u></b>
	<b><u>ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS</u></b>	<b><u>52</u></b>
	<b><u>PADĖKA</u></b>	<b><u>53</u></b>
	<b><u>LITERATŪROS SĄRAŠAS</u></b>	<b><u>54</u></b>
	<b><u>PRIEDAI</u></b>	<b><u>62</u></b>

## SANTRUMPOS

AI – angl. *Artificial Intelligence*; dirbtinis intelektas;

anti-EGFR – angl. *antibody to EGFR*; antikūnas prieš EGFR;

CDH1 – angl. *Cadherin 1*; Kadherinas;

EGFR, angl. *Epidermal Growth Factor Receptor*; epidermio augimo faktoriaus receptorius;

EMT – angl. *Epithelial Mesenchymal Transition*; epitelinis mezenchimins virsmas;

ER – angl. *Estrogen Receptor*; estrogeno receptorius;

ERK, angl. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*; ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė;

FBXW7 – angl. *F-Box And WD Repeat Domain Containing 7*; F-Box ir WD besikartojimo domenas 7;

FC – angl. *Fold Change*; skirtumas

GEP – angl. *Gene Expressing Profiling*; genų ekspresijos profiliavimas;

HER2 – angl. *Human Epidermal Growth Factor Receptor*; žmogaus epidermio augimo receptorius;

KRAS – angl. *Kirsten Rat Sarcoma Virus*; Kirsten Rat sarkomos virusas;

mAb - angl. *monoclonal antibody*; monokloninis antikūnas;

MAML1 – angl. *Mastermind Like Transcriptional Coactivator 1*; Į Mastermind panašus Transkripcijos koaktyvatorius 1;

MAPK – angl. *Mitogen-activated protein kinases*; Mitogeno aktyvuotos proteinkinazės;

MEK – angl. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase*, mitogeno aktyvuota proteinkinazė;

MRI - angl. *Magnetic Resonance Imaging*; magnetinio rezonanso vaizdai;

MRT – angl. *Magnetic Resonance Tomography*; magnetinio rezonanso tomografija;

mTOR - angl. *Mammalian target of rapamycin*; žinduolių rapamicino taikynys;

NGS -angl. *New Generation Sequencing*; naujos kartos sekos nustatymas;

PI3K/AKT -angl. *Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B*; fosfatidilinozitolio 3-kinazė /baltymų kinazė B;

PR – angl. *Progesterone Receptor*; progesterone receptorius;

RAS – angl. *Rat Adenocarcinoma*; žiurkės sarkomos viruso onkogeno homologas;

RTK- , angl. *Receptor tyrosine kinases*, tironizo kinazės;

siRNA- angl. *Small Interfering RNA*; maža slopinanti RNR molekulė;

siRNR-KRAS-A – angl. *siRNA against KRAS transcripts ‘ isoform A*; siRNR, nukreipta slopinti KRAS geno izoformą A;

siRNR-KRAS-B - angl. *siRNA against KRAS transcripts ' isoform B*; siRNR, nukreipta slopinti *KRAS* geno izoformą B;

TME- angl. *Tumour Microenvironment*, naviko mikroaplinka;

TNBC -angl. *Triple Negative Breast Cancer*; trigubai neigiamas krūties vėžys;

VIM – angl. *Vimentin*; vimentinas

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Dominyka Breimelytė

**Baigiamojo darbo pavadinimas**

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Krūties vėžys yra daugialypė ir nevienalytė liga, kai genų, tokių kaip *EGFR* ir *KRAS*, aberacijos labai prisideda prie naviko vystymosi, progresavimo ir atsparumo gydymui. Šie genai atlieka vaidmenį ląstelių procesuose, tokiuose kaip proliferacija, diferenciacija ir išgyvenimas. *EGFR* yra receptorių tirozino kinazė, o jo per didelė raiška arba mutacijos yra susijusi su prasta ligos prognoze. *KRAS* yra GTPazė, o joje esančios mutacijos lemia pasroviui esančių signalinių kelių aktyvumą, skatinantį onkogenezę. Todėl supratimas apie šių genų nutildymo poveikį platesniam genų raiškos profiliui skirtingose krūties vėžio ląstelių linijose gali atskleisti jų vaidmenį ligos patofiziologijoje.

Šiame tyrime nagrinėjami dinamiški genų pokyčiai dviejose skirtingo piktybiškumo krūties vėžio ląstelių linijose, MCF-7 ir MDA-MB-231, po genų nutildymo metodų, nukreiptų į *KRAS* izoformas A ir B, taip pat antikūną prieš *EGFR* baltymą. Abi ląstelių linijos atspindi skirtingus krūties vėžio piktybinius navikus, o jų molekulinis atsakas į šiuos nutildymo metodus gali suteikti vertingos įžvalgos apie pagrindinius naviko progresavimą ir metastazes reguliuojančius mechanizmus.

Abu nutildymo metodai darė įtaką ląstelių migracijos potencialui, o tai rodo, kad jie veikia šių ląstelių linijų metastazavimą. Konkretūs genų raiškos pokyčiai atspindėjo ir bendrus, ir unikalius atsakus visose ląstelių linijose, pabrėždami krūties vėžio heterogeniškumą molekulinio lygmeniu.

Šie rezultatai padeda suprasti sudėtingas molekulinės sąveikas krūties vėžio ląstelėse po genų slopinimo intervencijų. Jie sudaro pagrindą būsimiems tyrimams, siekiant toliau išaiškinti *KRAS* ir *EGFR* vaidmenį skirtinguose krūties vėžio potipiuose.

Dominyka Breimelytė

**Differential Gene Expression Changes in Breast Tumor Cell Lines of Varied Malignancy  
Grades Following Exposure to si-KRAS or Anti-EGFR**

Master's Thesis

SUMMARY

Breast cancer is a multifaceted and heterogeneous disease where aberrations in genes, such as *EGFR* and *KRAS*, contribute significantly to tumor development, progression, and resistance to therapy. These genes play roles in cellular processes like proliferation, differentiation, and survival. EGFR is a receptor tyrosine kinase, and its overexpression or mutation is associated with aggressive disease and poor prognosis. Similarly, *KRAS* is a GTPase, and mutations in it lead to constitutive activation of downstream signaling pathways promoting oncogenesis. Therefore, understanding the impact of silencing these genes on the broader gene expression profile in different breast cancer cell lines can shed light on their roles in disease pathophysiology.

This study examines the dynamic changes in gene expression in two distinct breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-231, following exposure to gene-silencing methods targeting *KRAS* isoforms A and B as well as an antibody to the EGFR protein. Both cell lines represent different malignancies within breast cancer, and their molecular response to these silencing methods can provide valuable insights into the underlying mechanisms governing tumour progression and metastasis.

Notably, both silencing methods had a significant impact on cellular migration potential, suggesting their influence on the metastatic capacity of these cell lines. The specific gene expression changes reflected both common and unique responses across the cell lines, underscoring the heterogeneity of breast cancer at the molecular level.

These findings contribute to our understanding of the complex molecular interactions in breast cancer cells following gene silencing interventions. They provide a foundation for future investigations to further elucidate the role of *KRAS* and EGFR in breast cancer progression and may inform the development of more effective therapeutic strategies targeting these critical genes in different breast cancer subtypes.

## IVADAS

Krūties vėžys vis dar išlieka viena iš labiausiai paplitusių onkologinių ligų visame pasaulyje. Jai būdingas nevienalytiškumas, skirtingi unikalūs molekuliniai ir fenotipiniai potipiai, lemiantys kintamą gydymo atsaką, dar labiau padidinantį šios ligos sudėtingumą. Ieškant veiksmingos terapijos labai svarbus yra molekulinų veikėjų, tokių kaip epidermio augimo faktorius (EGFR-angl. *Epidermal growth factor receptor*) ir *KRAS* (angl. *Kirsten rat sarcoma virus*) geno, įvertinimas *in vitro*.

EGFR, baltymas, sergant trigubu neigiamai krūties vėžiu (TNBC, angl. *triple negative breast cancer*), nustatoma net 78% padidėjusi raiška, vaidina gyvybiškai svarbų vaidmenį skatinant ląstelių dauginimąsi ir išgyvenimą. Todėl antikūno nukreipimas į EGFR gali veiksmingai slopinti arba sustabdyti krūties navikinių ląstelių proliferaciją (Cai *et al.*, 2020). *KRAS* genas, dažnai mutuojantis įvairiose vėžio formose, yra susijęs su signalo perdavimu ląstelių augimu, migracija ir diferenciacija. Taigi, panašiai, kaip slopinant EGFR antikūnu, *KRAS* geno raišką slopinant naudojant mažas tildančias RNR (siRNR, angl. *silencing interfering RNA*) būtų galima paveikti genų signalinį kelią, valdantį onkogenezės procesus (Ngamcherdtrakul & Yantasee, 2019). Taigi, tildant EGFR arba *KRAS* dvejomis skirtingomis siRNR, siekiama sutrikdyti ląstelių dauginimosi ir išgyvenimo procesus, kurie skatina naviko atsiradimą, veikdami skirtingais molekuliniais būdais.

Atliekant slopinimo tyrimus, *in vitro* svarbu pasirinkti tinkamą tiriamąjį objektą, norint įvairiapusiškai išsiaiškinti *KRAS* ir EGFR vaidmenį, sąsajas krūties vėžio tyrimų kontekste. Krūties navikinių ląstelių linijos, tokios kaip MCF-7 ir MDA-MB-231, yra itin populiarios ir svarbios dėl jų skirtingų savybių ir svarbos krūties vėžio tyrimams. MCF-7 yra gerai žinoma krūties vėžio ląstelių linija, kuri yra teigiama estrogenų receptoriams, išreiškianti aukštą EGFR lygį. Jis dažnai naudojamas kaip į hormonus reaguojančio krūties vėžio modelis (Vantangoli *et al.*, 2015). Tyrimai, susiję su EGFR tildymu MCF-7 ląstelėse, gali suteikti įžvalgų apie tokių gydymo būdų veiksmingumą sergant luminaliniu A krūties vėžiu. Na, o MDA-MB-231 yra įprastai priskiriama TNBC modelinei linijai, t.y. ji neišreiškia estrogenų receptorių, progesterono receptorių ar HER2. MDA-MB-231 ląstelių linija taip pat yra žinoma dėl savo *KRAS* taškinės mutacijos 13 kodone, kuri gali sukelti nekontroliuojamą ląstelių dalijimąsi, būdingą vėžinėms ląstelėms. todėl ji yra tinkamas modelis tiriant *KRAS* nutildymo atsaką (Fillmore & Kuperwasser, 2008). Šios navikinės ląstelių linijos gali padėti pagilinti supratimą apie tai, kaip EGFR ir *KRAS* raiškos moduliavimas gali paveikti skirtingus krūties vėžio potipius.

Pagrindinis šio tyrimo **tikslas** yra ištirti ir palyginti dviejų skirtingo piktybiškumo krūties vėžio ląstelių linijų MCF-7 ir MDA-MB-231 atsaką po poveikio antikūnu prieš EGFR (anti-EGFR) arba



KRAS-A bei KRAS-B raiškos slopinimo naudojant siRNR (siRNR-KRAS-A ir siRNR-KRAS-B).  
Siekiant įgyvendinti tyrimo tikslą, buvo iškelti **uždaviniai**:

1. Nuslopinti EGFR, naudojant antikūną, arba KRAS-A, KRAS-B, naudojant siRNR, pasirinktose krūties vėžio ląstelėse.
2. Įvertinti pasirinktų krūties vėžio ląstelių migracijos pokytį, praėjus 24 ir 48 val., po veikimo anti-EGFR arba siRNR-KRAS-A, arba siRNR-KRAS-B.
3. Įvertinti pasirinktų krūties vėžio ląstelių atsaką informacinės RNR lygiu, praėjus 24 val., po veikimo anti-EGFR arba siRNR-KRAS-A, arba siRNR-KRAS-B; naudojant kiekybinės PGR metodą ištirti *KRAS-A*, *KRAS-B*, *EGFR*, *FBX7*, *MAML1*, *CDH1* ir *VIM* genų raišką.
4. Palyginti pasirinktų krūties vėžio ląstelių atsaką į poveikį anti-EGFR arba siRNR-KRAS-A, arba siRNR-KRAS-B.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Krūties navikai ir jų mikroaplinka

Pagal pasaulinės sveikatos organizacijos duomenis krūties vėžys, liga, atsirandanti krūties audinyje, yra viena iš labiausiai paplitusių moterų vėžio formų visame pasaulyje, o 2020 m. diagnozuota apie 2,3 mln. naujų atvejų. Ši liga gali išsivystyti bet kurioje krūties dalyje, įskaitant pieno latakus, skiltelius ar aplinkinius audinius (Goff & Danforth, 2021). Negydomas krūties vėžys gali išplisti į kitas kūno dalis, sukeldamas sunkių sveikatos komplikacijų ir potencialiai mirtinų pasekmių (Park *et al.*, 2022). Įprastai, krūties vėžio navikai yra skirstomi pagal savo molekulinį profilį, atsižvelgiant į proliferacijos žymenį (Ki67, angl. *marker of proliferation*) estrogeno receptorių (ER, angl. *estrogen receptor*), progesterono receptorių (PR, angl. *progesterone receptor*) bei žmogaus augimo faktoriaus (HER2, angl. *human epidermal growth factor receptor*) raiškos lygį, ar šių receptorių buvimą/nebuvimą. Šių receptorių buvimas, kaip vaizduojama 1.1 pav., padeda identifikuoti ir klasifikuoti krūties vėžį į luminalinį A, B, panašus į normalų tipą (angl. *Normal-like*), HER2 bei TNBC (Fulford *et al.*, 2006).

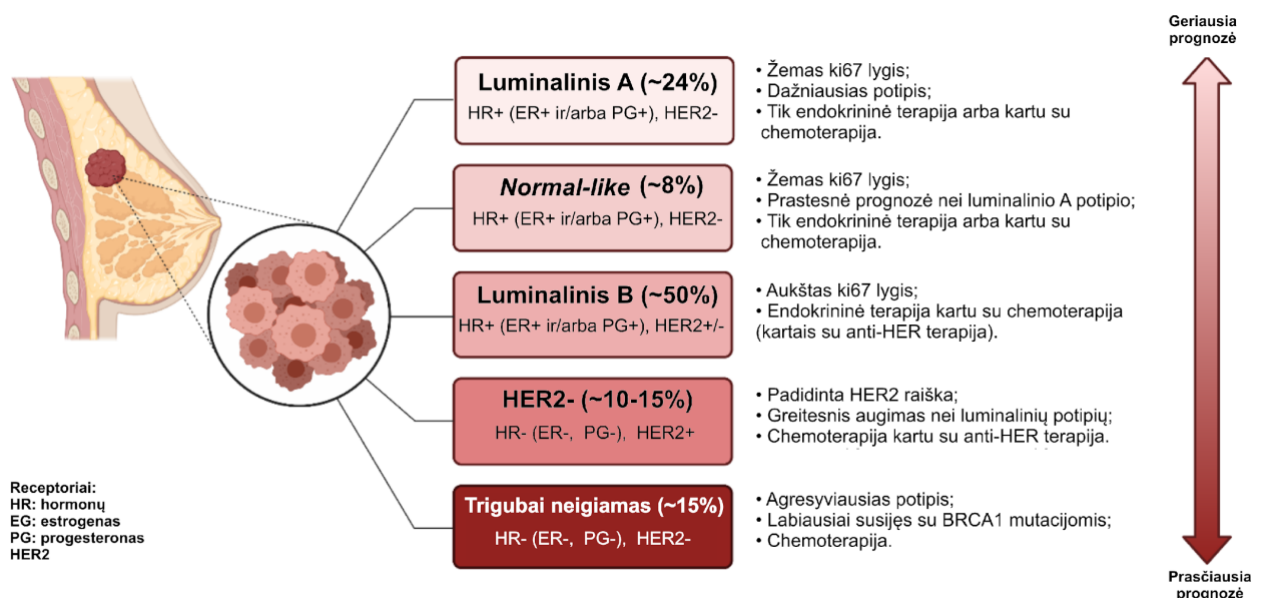
Molekulinis subtipas padeda pasirinkti specifinį ir unikalų gydymą krūties navikams. Kaip matoma 1.1 pav., luminalinis A krūties vėžio profilis įprastai gydomas endokrinine terapija, kuri būna nukreipta į ER ir PR (Goldhirsch *et al.*, 2011). Labiausiai paplitusi endokrininė terapija yra selektyvūs estrogenų receptorių modulatoriai ir aromatazės inhibitoriai, kurie blokuoja estrogenų aktyvumą organizme. Tyrimai parodė, kad endokrininė terapija veiksmingai sumažina pasikartojimo riziką ir pagerina pacientų, sergančių luminaliniu A krūties vėžiu, išgyvenamumą. Atlikti tyrimai rodo, kad penkerių metų gydymas aromatazės inhibitoriumi letrozolu sumažino pasikartojimo riziką moterims po menopauzės, sergančiomis hormonų receptorių teigiamu krūties vėžiu, įskaitant luminalinį A potipį (Poudel *et al.*, 2019). Kitas panašus potipis į luminalinį A yra panašus į normalų tipas, kuriam taikomos panašios gydymo strategijos kaip ir luminaliniam A, tačiau pacientams yra sunkesnė prognozė (Cejalvo *et al.*, 2017).

Luminalinis B krūties vėžys yra agresyvus ER+ krūties vėžio potipis, kurio išgyvenamumo ir gydymo prognozė pacientams yra prastesnė nei luminalinio A tipo. Paskutiniu metu, sergant pažengusiu arba metastazavusiu luminaliniu B (ER/PR+; HER2+) vėžio potipiu, įprasta praktika yra skirti lapatinibą kartu su aromatazės inhibitoriais, kurie yra atsakingi už androgenų ir estrogenų sintezę. Luminaliniame B tipe, pasižyminčiu padidėjusia ER raiška, kuri būna padidėjusi kartu su aromatazės raiška, toks gydymas gali sumažinti ER+ navikų proliferaciją (Bulun *et al.*, 1993) (Anurag *et al.*, 2020).

Kalbant apie HER2 tipą, reikia paminėti, kad tai yra onkoproteinas, priklausantis epidermio augimo faktoriaus receptorių šeimai, kuri kontroliuoja ląstelių augimą, išlikimą, diferenciaciją ir migraciją (Slamon *et al.*, 2001). Pernelyg didelė HER2 raiška ir amplifikacija yra dažniausiai pasitaikančios krūties vėžio anomalijos (Connell & Doherty, 2017). Į HER2 nukreiptas gydymas buvo patvirtintas krūties vėžio gydymui, įskaitant monokloninius antikūnus (pvz., trastuzumabą ir pertuzumabą), antikūnų ir vaistų konjugatus (pvz., ado-trastuzumabo emtanziną ir fam-trastuzumabo derukstekaną) ir mažų molekulių tirozino (KIskinazės) inhibitorius, pvz.: lapatinibą, neratinibą, pirotinibą ir tukatinibą) (Montemurro *et al.*, 2020). Šie tirozino kinazių inhibitoriai parodė gerą atsaką į gydymą pacientams, sergantiems HER2 vėžio tipu. (Ma *et al.*, 2019) (Murthy *et al.*, 2020).

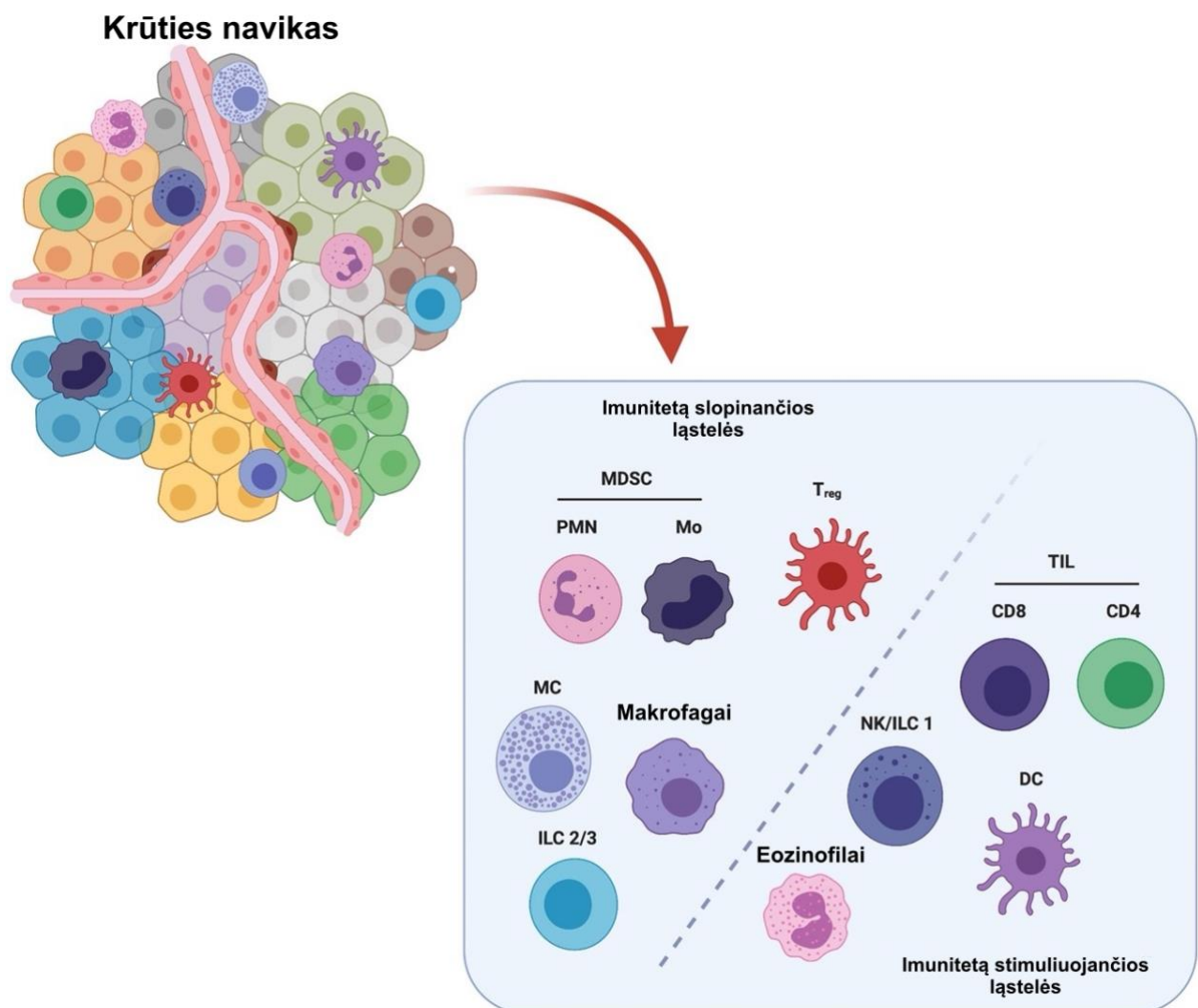
Labiausiai agresyviai krūties vėžio formai yra priskiriamas TNBC tipas, kuriam trūksta visų trijų anksčiau minėtų receptorių, aptinkamų kitose krūties vėžio formose: ER, PER, HER2. Anksčiau aptartose krūties vėžio formose esant šiems receptoriams yra lengviau taikyti tikslinį gydymą, nukreiptą tikslingai į receptorių, kurio raiška padidėjusi. Būtent dėl receptorių raiškos sumažėjimo gydymo galimybės yra apribotos sergant TNBC. Šiuo metu, chemoterapija išlieka veiksmingiausias šio tipo vėžio gydymo būdas (Bianchini *et al.*, 2022).

Taigi, kaip matoma 1.1 pav., skirtingi molekuliniai tipai gali padėti nustatyti kokį gydymą skirti būtų tikslingiausia.



**1.1 pav.** Krūties vėžio skirstymas, pagal molekulinį potipį, dažnį, piktybiškumą, prognozę, išgyvenamumą bei gydymą. Adaptuota pagal (Wawruszak *et al.*, 2021)

Tiriant krūties navikus svarbu akcentuoti ne tik tai, kas sudaro naviko molekulinį ir fenotipinį profilį, bet svarbu atkreipti dėmesį į naviko mikroaplinką (TME, angl. *tumor microenvironment*), kuri susidaro iš aplinkinių kraujagyslių, imuninių ląstelių, fibroblastų ir tarpląstelinės matricos. TME dažnai yra labai svarbus veiksnys naviko augimui ir progresavimui, taip pat atsakui į gydymą. Žinoma, kad imuninių ląstelių buvimas krūties TME gali turėti įtakos atsakui į gydymą. Imuninės ląstelės gali atpažinti ir užpulti vėžines ląsteles, tačiau navikai gali į jas reaguoti ir taip išvengti imuninės sistemos aptikimo. Todėl pastebima, kad navikai, turintys didesnę imuninių ląstelių skaičių (pvz., T ląstelės), labiau reaguoja į imunoterapiją – gydymo būdą, kuris skatina imuninę sistemą kovoti su vėžiu. Be to, TME gali turėti įtakos krūties vėžio ląstelių augimui ir plitimui, aprūpindama reikalingas maistines medžiagas ir signalines molekules (1.2 pav.). Kitas veiksnys, pvz., hipoksija ar mažas deguonies kiekis, gali skatinti naviko augimą ir atsparumą terapijai (Dias *et al.*, 2019).



**1. 2 pav.** Pagrindiniai krūties naviko TME veikėjai. PMC -polimorfonuklearinės ir Mo – monocitinės, MDSC - mieloidinės kilmės slopinančios ląstelės, MC- putliosios ląstelės, LC2/3 -

įgimtos 2 ir 3 tipo limfoidinės ląstelės, į M2 panašus navikas. Manoma, kad susiję makrofagai ir FoxP3+ reguliuojančios T ląstelės (Treg) turi imunitetą slopinantį poveikį, o TIL - į naviką patenkantys CD4+ ir CD8+ limfocitai, NK - natūralios žudikų, ILC1 - ląstelės/įgimtos limfoidinės 1 tipo ląstelės, DC - dendritinės ląstelės ir eozinofilai yra susiję su priešnavikiniu aktyvumu. Adaptuota, pagal (Salemme *et al.*, 2021)

Apibendrinus, ieškant krūties vėžio žymenų ir naujų strategijų prognostinavikus, yra svarbu atsižvelgti į sudėtingą ir įvairpusį naviko molekulinį profilį, įskaitant ir pačią TME. Taigi, išvalgos apie krūties vėžio biologiją, gali padėti ieškoti naujų terapinius taikinių ir paskatinti veiksmingesnių prognostinių išvalgų ir gydymo strategijų kūrimą.

## 1.2 Krūties navikų patologija

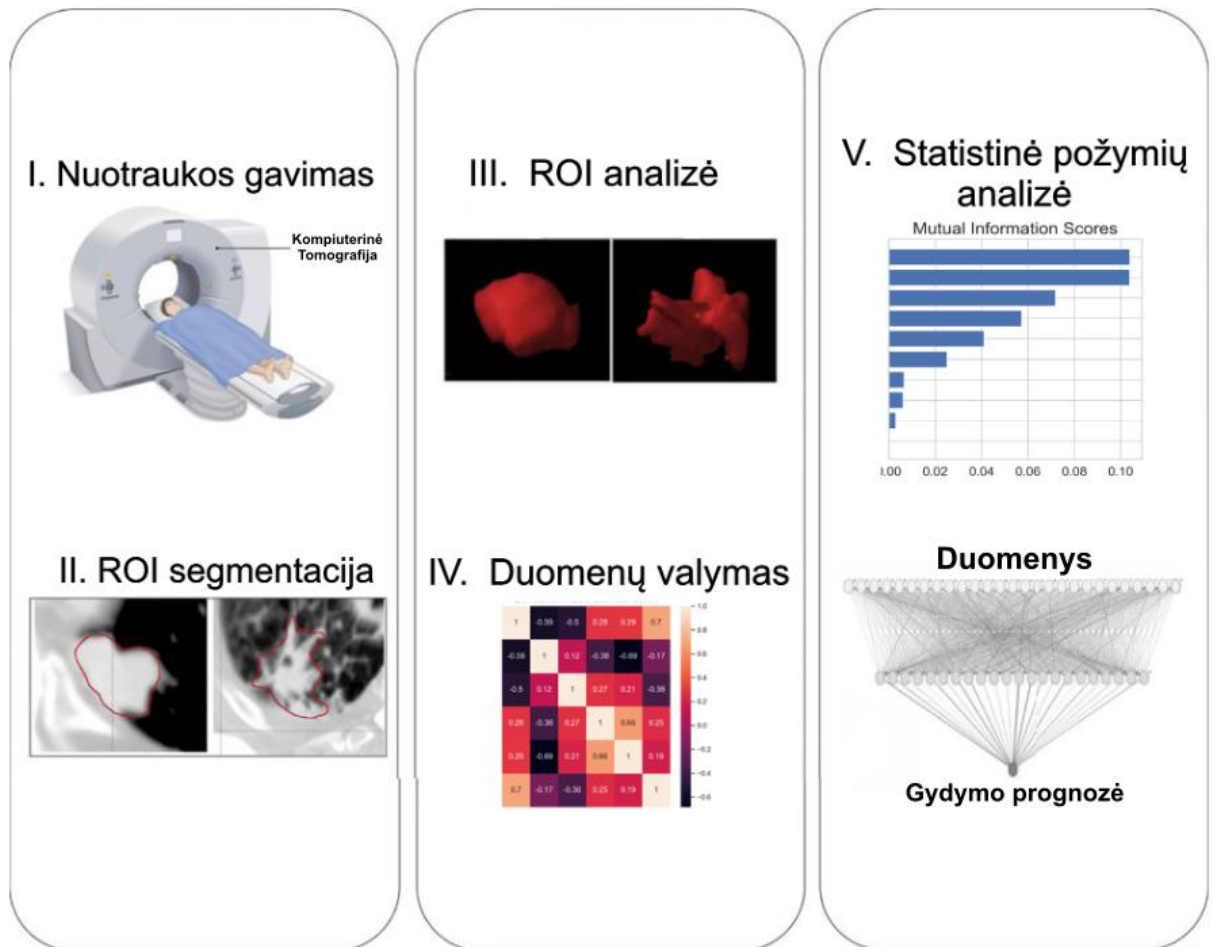
Krūties vėžiui dėl savo heterogeniškumo yra labai svarbi tiksli potipio analizė, kartu su molekulinio profiliu, norint nustatyti tinkamą gydymo strategiją ir gerinant pacientų atsaką į gydymą. Nors tradiciniai diagnostikos metodai, tokie kaip histopatologija ir imunohistochemija (Liu *et al.*, 2021), buvo ir vis dar yra naudojami krūties vėžio potipiams klasifikuoti, genetinių metodų ir vaizdo gavimo pažanga suteikė naujų galimybių tiksliau individualizuoti diagnozę (Sheth & Giger, 2020).

Genetiniai metodai, tokie kaip naujos kartos sekos nustatymas (NGS, angl. *new generation sequencing*) (Falcone *et al.*, 2023) ir genų ekspresijos profiliavimas (GEP, angl. *gene expression profiling*) (Tibshirani *et al.*, 2003), lėmė didelį proveržį krūties vėžio diagnostikoje ir klasifikavime. NGS leidžia identifikuoti somatines mutacijas ir gemalo linijos variantus, kurie gali sukelti naviko atsiradimą, o GEP gali susisteminti ir taip pateikti visuminį vaizdą apie naviko genų raiškos modelius. Šie metodai leido tiksliau suskirstyti krūties vėžio potipius, kurie gali būti tarpusavyje pasižymėti skirtingomis molekulinėmis savybėmis ir klinikiniais rezultatais.

Šiuo metu, perspektyvus krūties vėžio diagnostikos metodas yra magnetinio rezonanso tomografija (MRT, angl. *magnetic resonance tomography*), leidžianti pateikti išsamius krūties audinio vaizdus ir aptikti pažeidimus, kurių mamografijoje ar ultragarsu gali nesimatyti (Alam *et al.*, 2019). MRT taip pat gali suteikti funkcinės informacijos apie naviko mikroaplinką, pvz., kraujotaką ir deguonies tiekimą, kuri gali būti naudojama prognozuojant atsaką į gydymą. Nustatyta, kad MRT yra ypač naudingas diagnozuojant ir gydant didelės rizikos atvejus, vertinant pagal šeimos istoriją, pvz., turinčius *BRCA* mutacijas (Chaudhury *et al.*, 2021).

Šiuo metu, viena iš labiausiai besivystančių mokslo šakų yra radiogenomika, kuri taip pat atrodo perspektyvi krūties vėžio diagnostavimo tyrimų sričiai. Tikimasi, kad ateityje pasitelkus radiogenominius duomenis, juos galima bus analizuoti su dirbtinio intelekto (AI, angl. *Artificial*

*Intelligence*) ir mašininio mokymosi algoritmais, skirtais genetinių duomenų analizei (Bismejjer *et al.*, 2020). Šiuolaikinėje „omikų“ eroje, mašininio mokymosi bei AI algoritmai leidžia efektyviai dirbti su dideliais duomenų masyvais ir tokiu būdu kurti, analizuoti piktybinius navikų modelius, atrasti biologinius žymenis ir taip pagerinti diagnozės tikslumą bei gydymo atsako numatymą.



**1.3 pav.** MRI (angl. *magnetic resonance imaging*) analizės tyrimo eiga. ROI (angl. *region of interest*)

Apibendrinant galima pasakyti, kad genetiniai metodai ir MRT yra perspektyvios įvairių krūties vėžio potipių diagnozavimo ir klasifikavimo priemonės. Todėl, siekiant greitesnių ir tikslesnių rezultatų, svarbu plėsti radiogenomikos sritį, kuri pagreitina diagnostiką bei sumažina laiko sąnaudas.

### 1.3 Krūties navikų onkoproteinų duališkumas vėžio genetikoje

Onkogenai gali turėti dvejopų vėžio pasekmių, ir jų aktyvinimas gali sukelti naviką skatinantį ir naviką slopinantį poveikį. Onkogenų mutacijos gali nulemti sunkiai nuspėjamą toliau esančių genų kaskadų atsaką, valdantį ląstelių proliferaciją, augimą, migraciją, apoptozę, diferenciaciją bei

metabolizmą (Castel *et al.*, 2020). Todėl onkogenų funkcijų onkogenezės procese tyrimai vis dar yra platus neišspręstų medicinos problemų laukas.

Norint sukurti veiksmingą tikslinę terapiją, būtina nustatyti onkogenus, kurie atlieka svarbų vaidmenį vystantis ir progresuojant krūties vėžiui. Šis dvilypumas apsunkina jų, kaip terapinių tikslų, potencialą ir pabrėžia krūties vėžio heterogeniškos biologijos supratimo svarbą. Retų onkogenų nustatymas, kaip kad RET (angl. *rearranged during transfection*), FGFR1, FGFR2, FGFR3, turinčius dvejopą krūties vėžio baigtį, yra itin reikšmingas, nes jie gali būti unikalūs terapiniai krūties vėžio gydymo tikslai. Šių retų onkogenų gali turėti skirtingas funkcijas ir kelius nuo plačiai žinomų onkogenų, o jų nustatymas gali suteikti naujų įžvalgų apie krūties vėžio biologiją.

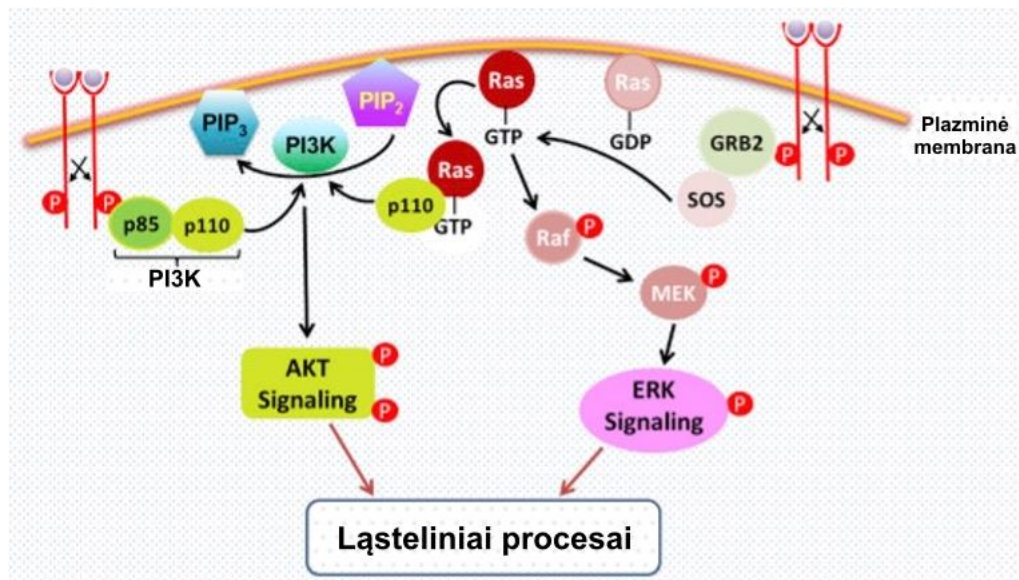
Apskritai onkogenų produktai onkoproteinai vaidina svarbų vaidmenį perduodant mitogeninius signalus, ypač RAS- mitogeną aktyvuojančios kinazės (MAPK, angl. Mitogen-activated protein kinases) ir fosfatidilinozitolio 3-kinazės (PI3K, angl. *phosphatidylinositol 3-kinase*) / baltymų kinazės B (AKT, angl. *protein kinase B*) keliuose (Sanchez-Vega *et al.*, 2018). Pavyzdžiui, receptorių tirozino kinazės (RTK, angl. *Receptor Tyrosine Kinases*), kurios yra pritvirtintos prie ląstelės paviršiaus, sąveikaudamos su baltymų ligandais, suaktyvina signalinių kelių kaskadas, kurios galiausiai lemia specifinius ląstelių fenotipus. Nors RTK aktyvinimas gali suaktyvinti unikalius efektorius, RAS-MAPK ir PI3K-AKT keliai yra pasroviui nuo daugumos RTK ir yra susiję su daugelio vėžio ir įgimtų sutrikimų vystymusi (Lemmon & Schlessinger, 2010). RTK genų mutacijos dažniausiai stebimos sergant vėžiu, o jų užkoduoti baltymai yra aktyvuojami per įvairias mutacijas - taškines, amplifikacijas, struktūrinius genų pokyčius, kas nulemia įvairialypį vėžio vystymuisi svarbių baltymų funkcionalumą (Robertson *et al.*, 2000).

#### **1.4 RAS onkoproteinai ir ERK/PI3K signalinių kelių sąsaja**

Prieš pradėdant kalbėti apie *ERK* bei *PI3K* signalinių kelių sąsają, svarbu paminėti MAPK kaskados kelią, kuris atlieka lemiamą vaidmenį perduodant ekstraląstelinius signalus į branduolį ir kontroliuojant keletą pagrindinių ląstelių procesų, įskaitant proliferaciją, diferenciaciją, migraciją, apoptozę ir išgyvenimą. Kelias apima pagrindinį trijų kinazių vienetą: MAPK kinazės kinazę (MAPKKK arba MAP3K), MAPK kinazę (MAPKK arba MAP2K) ir MAPK, kurios nuosekliai fosforilina ir aktyvina viena kitą (Dhillon *et al.*, 2007). Tarp skirtingų MAPK kaskadų ERK kaskadas yra labiausiai ištirtas, o jos reguliavimo sutrikimas buvo susijęs su keliomis ligomis, įskaitant vėžį.

Apžvelgta (1.4 pav.), kad ERK kaskadą aktyvuoja RAS šeimos baltymai HRAS, NRAS ir KRAS (Simanshu & Morrison, 2022). RAS baltymus aktyvuoja įvairūs veiksniai, įskaitant mitogenus (Sumimoto *et al.*, 2016), hormonus ir augimo faktorius, kurie jungiasi prie membraninių receptorių, tokių kaip su G baltymu sujungti receptoriai, interleukino receptoriai ir receptorių tirozino kinazės.

RAS molekulės yra mažos GTPazės, veikiančios kaip perjungimo jungikliai signaliniuose tinkluose. Prisijungę prie GTP, jie įgyja aktyvią konformaciją, leidžiančią susieti ir suaktyvinti pasroviui esančius efektorius ir perduoti signalą. RAS baltymai aktyvuojami įkeliant GTP ir deaktyvuojami hidrolizuojant GTP. Jų vidinė GTPazės ir nukleotidų mainų veikla yra silpna, o jų reguliavimą reguliuoja guanino nukleotidų mainų faktoriai ir GTPazę aktyvuojantys baltymai (GAP). RAS aktyvuoja kelis signalinius kelius, įskaitant RAF/MEK/ERK ir PI3K/AKT/mTOR kelius (1.4 pav.), kurių paplitimas skiriasi priklausomai nuo RAS izoformos, ląstelės tipo ir konteksto (Santos & Nebreda, 1989) (Prior *et al.*, 2020). Žinoma, kad RAS onkoproteino forma KRAS aktyvina fosfatidilinozitolio 3-kinazės (PI3K) kelią (Nussinov *et al.*, 2017). Taigi, PI3K / AKT ir ERK signaliniai keliai yra svarbūs KRAS ir krūties vėžio kontekste, nes vėžinėse ląstelėse jie dažnai yra nereguliuojami ir vaidina lemiamą vaidmenį skatinant ląstelių proliferaciją, išgyvenimą ir metastazes.



**1.4 Pav.** RTK aktyvuojamos autofosforilinant tirozino likučius po ligandų surišimo, kai Ras-GDP (neaktyvus) pavirsta į Ras-GTP (aktyvus). Suaktyvintas Ras suaktyvina Raf, suaktyvindamas ERK. Aktyvuotas Ras taip pat per p110 katalizinį aktyvina PI3K subvienetą, kuris fosforilina membranos lipidą PIP2 į PIP3. Tada PIP3 aktyvina AKT per PDK1 ir PDK2 fosforilinimo prijungimo vietas.



*PI3K/AKT* ir *ERK* signaliniai keliai atlieka lemiamą vaidmenį ląstelių proliferacijoje, išgyvenime ir diferenciacijoje. Aktyvintas *PI3K/AKT* kelias, skatina ląstelių išlikimą ir augimą, slopindamas apoptozę ir skatindamas ląstelių ciklo progresavimą. Šis kelias dažnai hiperaktyvinamas sergant daugeliu vėžio tipų, prisidedant prie naviko atsiradimo ir atsparumo vėžio terapijai išsivystymo. *ERK* kelias, taip pat žinomas kaip *MAPK/ERK* kelias, yra susijęs su ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir išgyvenimo reguliavimu. Suaktyvintas *ERK* persikelia į branduolį, kur gali suaktyvinti transkripcijos faktorius, kurie skatina ląstelių augimą ir proliferaciją. Šio kelio reguliavimo sutrikimas dažnai stebimas sergant įvairių tipų vėžiu (Guo *et al.*, 2020).

Tiek *PI3K/AKT*, tiek *ERK* keliai gali susikirsti ir paveikti epitelio-mezenchiminį perėjimą (EMT, angl. *epithelial-mesenchymal transition*), kuris yra labai svarbus vėžio metastazių procesas. EMT metu epitelio ląstelės praranda savo ląstelių ir ląstelių adheziją ir įgyja migracinių bei invazinių savybių, transformuodamos į mezenchimines ląsteles. Šį perėjimą palengvina įvairūs transkripcijos veiksniai, įskaitant Snail, Slug ir Twist, kuriuos gali reguliuoti *PI3K/AKT* ir *ERK*. *PI3K/AKT* ir *ERK* keliai, kai yra nereguliuojami, gali skatinti EMT procesą, prisidedant prie naviko progresavimo ir metastazių. Tai pabrėžia vėžio biologijos sudėtingumą ir šių kelių svarbą vėžio vystymuisi ir progresavimui.

EMT, leidžia epitelio ląstelėms, kurioms paprastai būdingas ląstelių poliškumas ir ribotas judrumas, atlikti biocheminius pokyčius ir pasiekti mezenchiminių ląstelių fenotipą (Park *et al.*, 2022). EMT metu ląstelės praranda savo epitelio savybes, įskaitant ląstelių ir ląstelių adheziją ir ląstelių poliškumą, ir įgyja mezenchimines charakteristikas, tokias kaip padidėjęs mobilumas ir invaziškumas. Šis procesas yra labai svarbus daugelyje fiziologinių procesų, įskaitant embriogenezę ir žaizdų gijimą, bet taip pat yra susijęs su patologiniais procesais, tokiais kaip fibrozė ir vėžio metastazės (Montemurro *et al.*, 2020).

Ląstelių plastiškumas, savybė, susijusi su EMT, prisideda prie naviko ląstelių išgyvenimo, migracijos, invazijos ir atsparumo terapijai. Daugelis veiksnių gali paskatinti epitelio plastiškumą, įskaitant aktyvuojančias *KRAS* mutacijas, kurios aptinkamos maždaug 30% visų vėžio atvejų. Onkogeninio *KRAS* ląstelių perprogramavimo supratimas gali atskleisti naujas *KRAS* sukeltų vėžio metastazių strategijas. Slopinimo nukreipimas į pagrindinius EMT reguliatorius, gali slopinti šio virsmo procesą ir sustabdyti vėžio progresavimą.

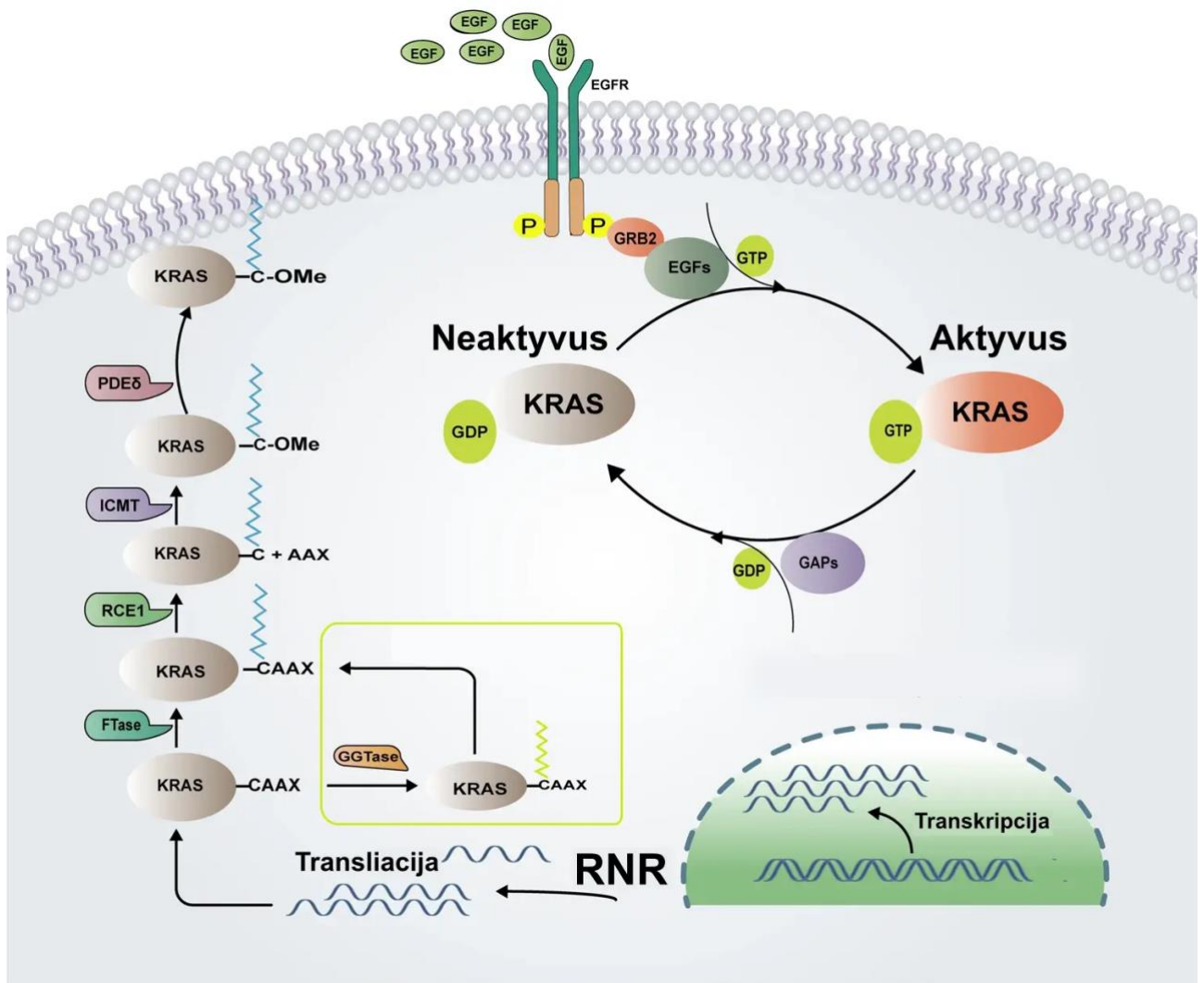
## 1.5 KRAS vaidmuo onkogenezėje

Nuo tada, kai pirmą kartą buvo pastebėtas onkogeninių RAS mutacijų onkogeninis potencialas *in vitro* (1.5 pav.), nustatyta, kad *KRAS* genų mutacijos yra labai paplitusios storosios žarnos, plaučių ir kasos karcinomose, taip pat krūties vėžyje (Prior *et al.*, 2020).

KRAS baltymas išsiskiria dviem savo izoformomis – KRAS-4A ir KRAS-4B. Dėl alternatyvaus ketvirtojo egzono sujungimo, šios izoformos skiriasi tik viena aminorūgštimi. KRAS-4B yra gausesnė izoforma ląstelėse ir paprastai vadinama KRAS (Karnoub & Weinberg, 2008).

Taigi, KRAS4A yra santykinai reta izoforma. Atlikti tyrimai ištyrė KRAS4A izoformos raišką ir funkciją sergant krūties vėžiu. Tyrimas parodė, kad, lyginant su normaliais audiniais ir ląstelių linijomis, KRAS4A yra labiau reguliuojamas krūties vėžio audiniuose ir ląstelių linijose. Be to, tyrimas parodė, kad KRAS4A išveiklinimas sumažino ląstelių proliferaciją, migraciją ir invaziją į krūties vėžio ląsteles. Šios išvados rodo, kad KRAS4A gali atlikti svarbų vaidmenį krūties vėžio vystymuisi ir progresavimui ir gali būti terapinis taikiny (Tsai *et al.*, 2015).

Tačiau KRAS4B yra dominuojanti izoforma daugumoje žmogaus audinių ir dažnai mutuoja navikuose. Gerai žinoma, kad KRAS4B mutacijos gali sukelti signalinių kelių nuolatinę aktyvaciją, lemiančią nekontroliuojamą ląstelių augimą ir proliferaciją, kurie galiausiai gali sukelti vėžį (Plowman *et al.*, 2006).



**1.5 Pav.** KRAS funkcijos. Normali KRAS funkcija priklauso nuo jo potranskripcijos modifikacijos membranos lokalizacijos, per kurią tarpininkauja daugybė fermentų. KRAS veikia kaip BVP- guanozindifosfato /GTP - trifosfato jungiklis, kuris kontroliuoja svarbų signalo perdavimą iš aktyvuotų membraninių receptorių į tarpląstelines molekules.

Taigi, nors KRAS4B mutacijos krūties vėžyje nėra tokios dažnos kaip kituose vėžio tipuose, tai vis dar yra svarbus vėžio terapijos tikslas (Plowman *et al.*, 2006). Suprasdami KRAS izoformų skirtingus vaidmenis krūties vėžio procese, galime gauti svarbių įžvalgų į krūties vėžio progresijos mechanizmus ir padėti sukurti efektyvesnes terapijas.

### 1.6 EGFR ir KRAS duališkumas krūties navikų kontekste

EGFR signalinis kelias vaidina lemiamą vaidmenį sergant daugeliu vėžio formų, o jo slopinimas jau keletą metų buvo tikslinės terapijos tikslas. Tačiau atsparumas anti-EGFR terapijai yra pagrindinė problema, ir buvo nustatyta, kad *KRAS* mutacijų buvimas gali leisti kelti prielaidą,

kad pacientai, sergantys vėžiu gali nereaguoti į tikslinį gydymą prieš EGFR antikūnus (Siddiqui & Piperdi, 2010).

Nors ir daugiausia dėmesio buvo skiriama *KRAS* mutacijoms sergant nesmulkiaūstelinio plaučių vėžiu (L. Wang *et al.*, 2014) ir gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžiu (Siddiqui & Piperdi, 2010), *KRAS* mutacijų tyrimų svarba apima ir kitus vėžio tipus, įskaitant krūties vėžį, kurios nors ir palyginus retos, turi didelę reikšmę (Tokumaru *et al.*, 2020). Kaip jau aptarta, *KRAS* mutacijų buvimas šiose vėžio formose gali nepalankiai organizmui veikti imuninę sistemą, tokiu būdu slopinti organizmo gebėjimą kovoti su naviku, ir nulemti mažiau palankią naviko atsako į gydymą prognozę (Liao *et al.*, 2019).

Vėžinėse ląstelėse aptinkamos EGFR ir *KRAS* genų mutacijos. Pavyzdžiui, sergant plaučių vėžiu, EGFR mutacijos dažniausiai aptinkamos sergant nesmulkiaūstelinio plaučių vėžiu ir yra susijusios su padidėjusiu jautrumu EGFR inhibitoriams. Vis dėlto, *KRAS* mutacijos yra susijusios su atsparumu EGFR inhibitoriams ir blogesne prognoze. Tokiais atvejais nukreipimas į EGFR gali būti neveiksmingas, nes *KRAS* mutacijos gali suaktyvinti signalinius kelius pasroviui net ir esant EGFR inhibitoriams gaubtinės žarnos navikuose (Lievre *et al.*, 2008). Taigi, ryšys tarp *KRAS* ir EGFR sergant vėžiu yra sudėtingas ir dažnai apibūdinamas kaip duališkumas, kadangi, pasireiškiant abejoms mutacijoms, gali atsispindėti ir naviką skatinantys progresuoti, ir naviką slopinantys veiksniai.

Viena vertus, *KRAS* aktyvacija yra susijusios su padidėjusia ląstelių proliferacija, išgyvenimu ir atsparumu chemoterapijai. *KRAS* mutacijos taip pat gali suaktyvinti pasroviui esančius signalinius kelius, tokius kaip *RAS/MAPK* ir *PI3K/AKT* kelius, kurie skatina ląstelių augimą ir išgyvenimą (Tokumaru *et al.*, 2020).

Kita vertus, EGFR gali turėti ir naviką skatinantį, ir naviką slopinantį poveikį. Žinoma, kai EGFR yra pernelyg išreikštas, padidėja ląstelių proliferacija, išgyvenamumas ir metastazės. Tačiau kitais atvejais, priklausomai nuo naviko lokalizacijos, tipo ir mikroaplinkos, EGFR gali elgtis priešingai - naviką slopinti, sukeldamas ląstelių ciklo sustabdymą arba apoptozę (Sooro *et al.*, 2018).

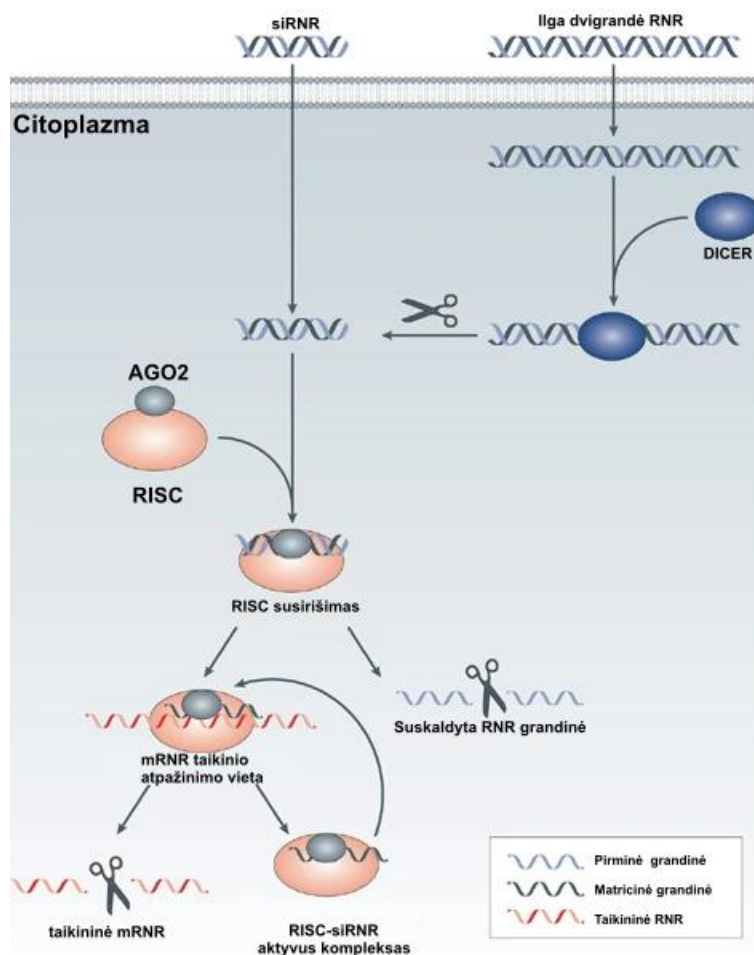
Ryšys tarp *KRAS* ir EGFR sergant vėžiu nėra paprastas ir priklauso nuo specifinio ląstelių konteksto ir susijusių signalinių kelių. Norint sukurti veiksmingą tikslinę vėžio gydymo terapiją, svarbu suprasti molekulinis mechanizmus, kuriais grindžiamas šių veiksmių sąveika ir dalyvavimas vėžyje.

## 1.7 Šiuolaikiniai genetiniai slopinimo būdai ir praktika

Taikant interferuojančios RNR (RNAi) metodą RNR yra nukreipiama į konkrečius genus ir juos nutildo. Viena iš interferuojančios RNR molekulių yra maža tildanti dvigrandė RNR (siRNR) molekulė, sugebanti prisijungti prie specifinių RNR sekų. siRNR gali būti labai veiksminga nukreipiant į dominančius genus, tačiau organizmo ląstelėms gali būti sunku siRNR paimti ir ji gali lengvai susiskaidyti. siRNR yra dvigrandė RNR molekulė, galinti prisijungti prie specifinių pasiuntinių RNR (mRNR) ir jas suskaidyti, o tai lemia tikslinio geno raiškos nutildymą (Hu *et al.*, 2020).

siRNR, kurios ilgis įprastai yra 18-22 nt, gali nukreipti ir suardyti specifinius mRNR genus (1.6 pav.), todėl tiksliam jos veikimui yra svarbu:

- **Specifiškumas:** siRNR turėtų būti sukurta taip, kad būtų nukreipta į konkrečią mRNR seką ir neturėtų jokio pašalinio poveikio. Specifiškumas gali būti pagerintas naudojant siRNR projektavimo įrankius, kuriuose atsižvelgiama į tikslinę mRNR seką, termodinaminį stabilumą ir galimus netikslinius efektus (Seok *et al.*, 2018).
- **Įsisavinimas:** siRNR turėtų sugebėti efektyviai nutildyti tikslinio geno ekspresiją. Įsisavinimą galima pagerinti optimizuojant siRNR koncentraciją, transfekcijos sąlygas ir pristatymo būdą (Shinohara *et al.*, 2021).
- **Stabilumas:** siRNR turi būti stabili ir greitai neskaidoma endogeninių nukleazijų. Stabilumą galima pagerinti modifikuojant siRNR struktūrą, pavyzdžiui, naudojant chemiškai modifikuotus nukleotidus (Elmén *et al.*, 2005).
- **Mažas imunogeniškumas:** patekusi į ląsteles, siRNR neturėtų sukelti imuninio atsako. Imunogeniškumą galima sumažinti naudojant siRNR su atitinkamomis modifikacijomis arba tiekimo sistemomis (Kanasty *et al.*, 2012).
- **Minimalus netikslinis poveikis:** siRNR neturėtų nutildyti nenumatytų genų ar turėti kitokio netikslinio poveikio. Netikslinius efektus galima sumažinti naudojant siRNR projektavimo įrankius, kurie vengia homologijos su kitais genais, ir atliekant atitinkamą kontrolę (Khvorova & Watts, 2017).

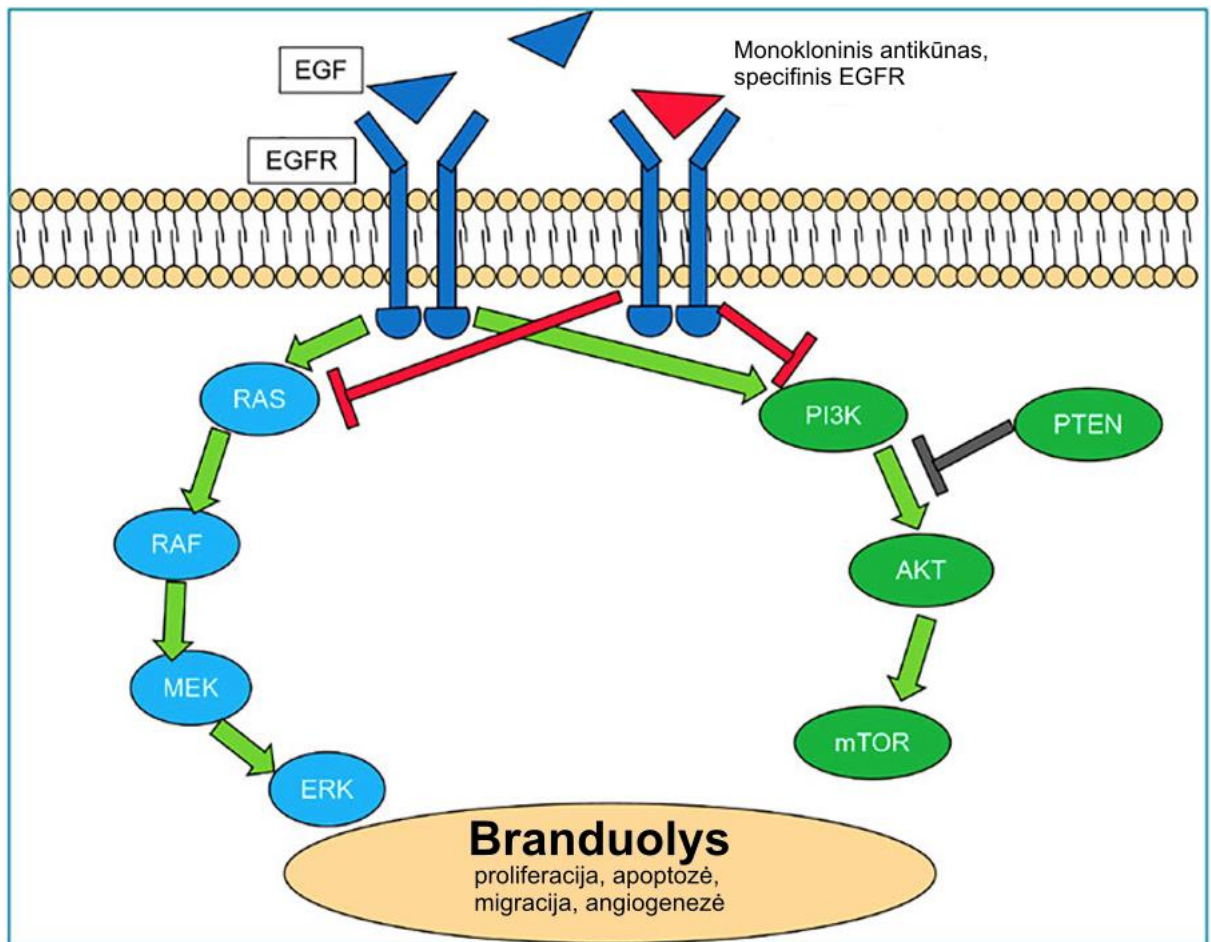


**1.6 pav.** Ilga dvigrandė RNR (dsRNR) įvedama į citoplazmą, kur fermentas Dicer suskaido į siRNR. Arba siRNR gali būti įvedama tiesiai į ląstelę. Tada siRNR yra įtraukta į RNR sukeltą tildymo kompleksą (RISC), todėl RNR jutimo grandinė suskaidoma argonaute 2 (AGO2). Suaktyvintas RISC – siRNR kompleksas ieško, jungiasi ir suskaido komplementarią mRNR, o tai lemia tikslinio geno nutildymą. Tada aktyvuotas RISC – siRNR kompleksas gali būti perdirtas, kad būtų sunaikinti identiški mRNR taikiniai. Adaptuota (Whitehead *et al.*, 2009)

Apibendrinant, siRNR yra viena iš vėžio genų modeliavimo strategijų, siekiant selektyviai nutildyti tikslinių genų ekspresiją. siRNR gali būti sukurtos taip, kad būtų nukreiptos į *KRAS* raiškos tildymą, taip slopinant krūties vėžio ląstelių augimą ir dauginimąsi (Zhang *et al.*, 2020). Be to, tyrimai su navikinėmis krūties vėžio ląstelių tyrimais parodė efektyvumą tildant *KRAS* ir epitelinio-mezenchiminio virsmo kelią, kuris tiesiogiai siejasi su metastazių tikimybe (Zhang *et al.*, 2020). Todėl siRNR pagrįsta terapija, skirta *KRAS*, gali būti vienas iš perspektyvių krūties vėžio gydymo metodų.

Būtina paminėti antikūnus, kurių poveikis nukreiptas į specifinius baltymus, jau senai įsitvirtino medicinoje kaip gana efektyvus ir perspektyvus būdas gydyti krūties vėžį (1.7 pav). Terapinių antikūnų sritis sparčiai plėtėsi ir šie veiksniai tapo vieni plačiausiai naudojamų, vis dar

turintys didelį taikymo gyvymui vystymo potencialą. Antikūnai tradiciškai buvo naudojami vėžiui, autoimuninėms ligoms ir infekcinėms ligoms gydyti (Lu *et al.*, 2020).



**1.7 pav.** EGFR kelias. Piktybinėse ląstelėse EGF susijungia su EGFR ir aktyvuoja EGFR kelią, kuris inicijuoja signalinių kelių kaskadą pasroviui per RAS/RAF/MAPK ir PI3K/AKT/mTOR ašis, o tada skatina ląstelių proliferaciją. anti-EGFR mAb dėl konkurencinio prisijungimo prie ekstraląstelinio EGFR domeno sukelia receptorių degradaciją ir EGFR signalo perdavimo kelio slopinimą, taip pat dėl nuo antikūnų priklausomo citotoksinio poveikio slopina EGFR proliferaciją. naviko ląstelės ir sukelti apoptozę, kad būtų pasiektas naviko kontrolės efektas. Adaptuota pagal (Yuan *et al.*, 2022)

Antikūnai gali būti sukurti taip, kad nukreiptų į specifinius vėžinių ląstelių paviršiaus baltymus, kuriuos imuninė sistema gali atpažinti ir sunaikinti. Viena iš galimų krūties vėžio gydymo strategijų, skirta nukreipti į EGFR, yra monokloninių antikūnų (mAb), kurie specifiskai jungiasi prie EGFR ir blokuoja jo funkciją, naudojimas. EGFR mAb jungiasi prie tos pačios vietos, kur paprastai jungiasi EGFR ligandai ir taip užkerta kelią EGFR aktyvacijai ir dimerizacijai (E. S. Kim *et al.*, 2001). Kai antikūnas prisijungia prie EGFR, vėžio ląstelė internalizuoja ir skaido EGFR baltymą (Doody *et al.*, 2007). Be to, nustatyta, kad EGFR mAb stimuliuoja imuninį atsaką prieš vėžines ląsteles. Jie skatina imuninę sistemą atakuoti vėžines ląsteles per mechanizmą, vadinamą

nuo antikūnų priklausomu ląstelių sukeltu citotoksiškumu, kai imuninės ląstelės, tokios kaip natūralios žudančios ląstelės, atpažįsta ir sunaikina vėžines ląsteles, pažymėtas EGFR mAb. Be to, EGFR mAb taip pat gali stimuliuoti T-ląstelių sukeltą imuninį atsaką, kai T ląstelės atpažįsta ir tiesiogiai sunaikina vėžines ląsteles (Trivedi *et al.*, 2014).

Apibendrinant, galima pastebėti, kad KRAS raiškos slopinimas, pavyzdžiui, naudojant RNAi, ir antikūnai prieš EGFR gali turėti sinerginį poveikį ir pagerinti EGFR slopinimo veiksmingumą sergant krūties vėžiu. Norint visiškai suprasti šių strategijų potencialą efektyviam gydymui, reikia atlikti detalesnius ir išsamesnius tyrimus.



## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Medžiagos

#### Tiriamasis objektas:

Žmogaus krūties navikinių ląstelių linijos MCF-7 ir MDA-MB-231: padovanotos

#### Nacionalinio vėžio instituto Imunologijos laboratorijos

#### 2.1 lentelė. Naudotų medžiagų sąrašas

Medžiaga	Gamintojas
Kriogeniniai mėgintuvėliai	<b>CryoKING, Kinija</b>
10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL sterilūs RAININ antgaliai	<b>Mettler-Toledo, JAV</b>
15 mL, 50 mL sterilūs centrifuginiai mėgintuvėliai	<b>NerbePlus, Vokietija</b>
24 šulinėlių, 48 šulinėlių TPP® plokštelės Anti-EGFR (Ab-3) Mouse mAb (225) Acto rūgštis 100%, etidžio bromido tirpalas Neutral Red dažas	<b>Sigma-Aldrich, Vokietija</b>
50x TAE elektroforezės buferinis tirpalas 96 šulinėlių plokštelė antibiotikai (penicilinas 10 000 vnt/mL, streptomocinas 10 000 µg/mL); BioLite 25 cm <sup>2</sup> flakonai First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase GeneJET RNA Purification Kit Genų raiškos rinkinys "Applied Biosystems SYBR Green™ PCR Master Mix" Invitrogen Dimetilsulfoksidas (DMSO): Lipni PGR skirta plėvelė Minimum Essential Medium (MEM) Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium Gibco™ RNA Ladder High Range RNR ilgio standartas; 6x Loading dye elektroforezės dažas siRNR rinkinys "Invitrogen Silencer® Select siRNA" skaičiavimo plokštelės Countess Counting Chamber Slides TopVision Low Melting Point agarozė Transfekcijos reagentas "Invitrogen Lipofectamine™ RNAiMAX" tripano mėlio tirpalas veršelio serumas (FBS) Dulbecco fosfatinių druskų buferis (DPBS) 200 µL mikromėgintuvėliai	<b>ThermoFisher, JAV</b>
96 % etanolis	<b>Vilniaus degtinė, Lietuva</b>

**Tyrimo metu naudota įranga:**

Automatinis ląstelių skaičiuotuvas Countess™ 3 FL: **Invitrogen**

Centrifūga 5424 ir 5810R: **Eppendorf**

Gelių dokumentavimo sistema MiniBIS Pro: **DNR Bio-Imaging systems**

Horizontali gelių elektroforezės sistema – elektroforezės srovės šaltinis BluePower500 ir elektroforezės vonelė: **Serva**

II saugumo klasės laminarinė traukos spinta: **Alpina**

Mikocentrifūga Micro22: **Hettich**

Mikroskopas Eclipse TS100: **Nikon**

Mikroskopo kamera DS-Fi2: **Nikon**

Spektrofotometras NanoDrop One C: **ThermoScientific**

Termocikleris Labcycler: **Senso Quest GmbH**

Varioskanas LUX: **ThermoScientific**

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System, 96-well, 0.2 mL: **ThermoScientific**

**Tyrimo metu naudota programinė įranga:**

Eurofins Genomics' **siRNA design** tool

ImageJ su Java 1.8.0

Microsoft Access, versija 16.72

Microsoft Excel, versija 16.83

Mikroskopo kamerai pritaikyta įranga NIS Elements, versija 4.00

Python, versija 3.11.3

STRING internetinis įrankis, versija 11.5

Varioskano programinė įranga Skanit RE, versija 6.02

## **2.2 Metodai**

### **2.2.1 Ląstelių kultivavimas ir kultūros**

Žmogaus krūties navikinės ląstelių MCF- 7 ir MDA-MB-231 linijos buvo augintos MEM mitybinėje terpėje, praturtinta 1 % antibiotikų mišiniu (penicilinu 10 000 vnt./mL ir streptomycinu 10 000 µg/mL) ir 10 % veršelio serumu. Ląstelės išsėtos ląstelių auginimo flakonuose ir plokštelėse, o po to auginamos inkubatoriuje, kuriame palaikoma drėgmė, 5 % CO<sub>2</sub> ir 37 °C temperatūra.

Ląstelės buvo persėjamos pasiekus 80-90 % tankį. Persėjimo metu buvo nusiurbiami ląstelių mitybinė terpė, flakono dugnas buvo praplaunamas Dulbecco fosfatiniu buferiu ir po to užpilama natūraliu proteolitinių ir kolagenozinių fermentų tirpalu ląstelių atkabinimui nuo flakono dugno. Po ląstelių inkubacijos su fermentų mišiniu inkubatoriuje, ląstelės buvo persėtos 1:4 santykiu ir eksperimentuose naudotos logaritminio augimo fazėje.

### **2.2.2 Ląstelių atšildymas**

MCF-7 ir MDA-MB-231 atšildytos vandens vonelėje 37 °C temperatūroje. Atšildyta ląstelių suspensija sulašinta į auginimo terpę (MEM+1% antibiotikai) su 10% FBS, nucentrifuguota. Nupylus supernatantą, suspenduota ir auginta terpėje (MEM+1% antibiotikai) su 20% FBS, 37 °C 5% inkubatoriuje. Po 24 val., ląstelėms terpė pakeista į įprastą auginimo terpę MEM+1% antibiotikai) su 10% FBS.

### **2.2.3 Ląstelių užšaldymas**

MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės šaldytos šaldymo terpėje, kurią sudaro 90% FBS + 10% DMSO. Po ląstelių atkabinimo su 1ml EDTA-tripsino tirpalo/akutazės tirpalu, ląstelės nucentrifautos, suspenduotos ir išpilstytos į kriogeninius mėgintuvėlius, juos perkėlus į -80 °C šaldiklį. Po 24 val., ilgalaikiam saugojimui ląstelės perkeltos į -150 °C šaldiklį.

### **2.2.4 Reagentų citotoksiškumo nustatymas**

Norint nustatyti eksperimente naudojamų siRNR ir antikūno prieš EGFR citotoksiškumą krūties navikinių ląstelių linijos buvo išsėtos į 24 šulinėlių plokšteles  $5 \cdot 10^5$  tankiu. Po 24 val. auginimo ląstelės toliau parą buvo inkubuojamos su 5 pM siRNR arba 20 µM antikūnu prieš EGFR. Praėjus inkubacijos laikui, reagento citotoksiškumas buvo nustatomas su neutraliai raudonu dažu, kurį pasisavina gyvybingų ląstelių lizosomos aktyviojo transporto būdu. Prieš eksperimentą dažas

buvo skiedžiamas su ląstelių mitybine terpe iki 0,4 % koncentracijos ir paliktas 2 val inkubatoriuje, norint jį prisotinti CO<sub>2</sub>. Po inkubacijos dažas nucentrifuguojamas 600 x g 10 min. Po dažo pasisavinimo ląstelės yra praplaunamos.

Prieš naudojimą mišinys buvo nucentrifuguotas 600 x g 10 min. Po 24 val. poveikio siRNR ir antikūnu prieš EGFR ląstelių terpė buvo pakeista į terpę su Neutral Red (0,4 %) ir ląstelės plokštelės paliktos inkubatoriuje 2 val. Po to terpė nusiurbta, ląstelės praplautos su DPBS ir Neutral Red dažas tirpintas 100 µL 0,5 % acto rūgšties. Varioskanas LUX naudotas 10 min. vidutiniu greičiu kratyti plokštelę ir pamatuoti optinio tankio sugertį ties 540 nm. Ląstelių morfologijos pokyčiai buvo stebėti po 24 val. invertuotu mikroskopu fotografuojant šulinėlius. Gyvybingumo tyrime abiejų ląstelių linijų kiekvienai sąlygai buvo atlikti trys biologiniai pakartojimai bei bent trys nepriklausomi eksperimentai. Ląstelių gyvybingumas buvo apskaičiuotas kaip visų nepriklausomų eksperimentų kontrolės procentinė išraiška.

### 2.2.5 Ląstelių transfekcija siRNR

MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės transfekcijai siRNR išsėtos 5 x 10<sup>5</sup> ląst/cm<sup>3</sup> tankiu, MEM terpėje. Transfekcija siRNR padaryta 24 val. po ląstelių išsėjimo, ląstelės buvo stebimos šviesiniu invertuotu mikroskopu, nustatomas citotoksiškumas po 24 val. Nustačius citotoksiškumą, pagal gamintojo (Invitrogen) rekomendacijas, ląstelės transfektuotos, kartu su siRNR, slopinančia Kras-A ir Kras-B Kras geno (geno bankų nr NM\_033360.4, nr. NM\_004985.5) transkriptų raišką ir siRNR, kuri nesavita jokiam žmogaus genui (NK-siRNR), bei teigiama kontrole (TK-siRNR), nurodytos 2.1 lentelėje. Norint sukontrouoti siRNR buvo pasitelkta Eurofins Genomics' **siRNA design** tool įrankis, pažymint seką, kuri skiriasi tarp 4 egzono alternatyvaus splaisingo variantų.

2.2 lentelė. siRNR sekos

siRNR	Vedančioji siRNR grandinė	Keleivinė siRNR grandinė
siRNR-Kras-A	5'UAUUGUCGGAUCUCUCACACC 3'	UGAGAGAGAUCCGACAAUAtt
siRNR -Kras-B	5'AACUAAUGUAUAGAAGGCAUC 3'	UGCCUUCUAUACAUAUAGUUtt

Transfekcijos metu ląstelės buvo pasiekusios 60-80% konfultentiškumą. Lėkštelei paruoštas transfekcijos mišinys -siRNA ir Lipofectamine RNAi MAX reagento kompleksas: per šulinėlį 24 šulinėlių plokštelėje 10 pmol siRNR skiesta su 25 ul OptiMEM terpe, bei 1,5 ul RNAiMAX skiestas su 25 ul OptiMEM terpe, sumaišius santykiu 1:1 praskiestus transfekcijos reagentą su

siRNR, buvo sumaišyta ir inkubuota 5 min, o vėliau susidarę kompleksai tolygiai sulašinti ir paskirstyti lėkštelėje su ląstelėmis. Eksperimentas, atliktas su 3 techninėmis ir 2 biologinėmis kopijomis.

### 2.2.6 Ląstelių kultūrų migracijos tyrimas

Ląstelių migracijos tyrimas prieš ir po poveikio su siRNR ir anti-EGFR buvo atliktas naudojant padarant „žaidą“ su 10ul pipetės antgaliu.

MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės išsėtos į 24 šulinėlių plokštelę po 5·10 ląst. / šulinėlį. Ląstelės paliekamos 24 val. inkubatoriuje įprastomis sąlygomis (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ir po to transfekuotos ir veiktos prieš antikūną EGFR. Praėjus parai, ląstelės praplautos su DPBS ir pakeista į mitybinę terpę.

Ląstelių migracija stebima fotografuojant ląsteles invertuotu mikroskopu iki tarpo („žaidos“) užsidarymo (arba šiuo atveju MCF-7 ląstelėms – neilgiau 3 dienų). Duomenys analizuojami matuojant neužsidariusios „žaidos“ paviršiaus plotą su ImageJ programa ir išreiškiant migravimą kaip kontrolės (pradinio paviršiaus ploto) procentinę išraišką. Duomenys vaizduojami naudojant Microsoft Excel (2018) kaip užsidariusios žaidos procentinę išraišką pagal formulę:

$$S_{\text{Pav.}}(\text{užsidariusios „žaidos“}) = 100 \% - S_{\text{Pav.}}(\text{neužsidariusios „žaidos“})$$

$S_{\text{Pav.}}$  – paviršiaus plotas.

### 2.2.7 Visuminės RNR išskyrimas bei kokybinis ir kiekybinis įvertinimas

MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelės buvo išsėtos į 24 šulinėlių plokštelę po 5·10<sup>5</sup> ląst. / šulinėlį ir inkubuojamos 24 val. Tada terpė nusiurbta ir kontroliniuose šulinėliuose pakeista į naują terpę, o poveikio šulinėliuose į terpę su 10 μM siRNR koncentracija ir 2 uM antikūnu prieš EGFR. Po 24 val. poveikio ląstelių kultūrose terpė buvo nusiurbta, ląstelės praplautos su DPBS, ir atkabintos su Accutase fermentų mišiniu. Ląstelių kultūros buvo nucentrifugutos ir surinktos į mėgintuvėlį, 300 x g 5 min, supernatantas pašalintas ir ląstelės suspenduotos. Toliau MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių kultūrų visuminė RNR išskirta naudojant *GeneJET RNA Purification Kit* pagal gamintojo rekomendacijas (Thermofisher). Išskirtos visuminės RNR kokybė ir koncentracija nustatyta naudojant *NanoDrop One C* spektrofotometrą pagal gamintojo rekomendacijas (Thermofisher).

Buvo naudojamas 1 μl kiekvienos sąlygos RNR mėginio. Optinės sugertis ties 260 nm ir 280 nm santykis  $A_{260/280}$  naudotas įvertinti RNR grynumą. Grynos RNR vertė turėtų būti ~ 2,0. 260 nm

ir 230 nm santykis  $A_{260/230}$  įvertina nukleorūgščių grynumą ir užteršimą organinėmis medžiagomis. Šis įvertis turėtų būti intervale 2,0–2,2.

Išskirtos visuminės RNR integralumas įvertintas agarozės gelyje. Paruoštas 1,5 % agarozės gelis (1,5 g agarozės ištirpinta 100 mL elektroforezės buferinio tirpalo (0,04 M tris–acetato, 0,001 M EDTA). Agarozei ištirpus įpilta 1 % EtBr tirpalas ir išmaišyta. Agarozės tirpalas atšaldytas iki 60–70 °C ir atsargiai supiltas į paruoštą gelio formavimo vietą (su „šukomis“ suformuoti duobutes) horizontaliame elektroforezės aparate. Sustingus agarozei, „šukos“ ištrauktos, gelis perkeltas į elektroforezės aparatą. Elektroforezės buferinis tirpalas įpiltas taip, kad gelis būtų visiškai apsemtas. Šaldomajame stovelyje mikromėgintuvėliuose paruošti mėginiai: 5 µL išgrynintos RNR mėginio sumaišyta su 5 µL 2x elektroforezės dažų; 2 µL RNR ilgio standarto sumaišyta su 2 µL 2x elektroforezės dažų; neigiamai kontrolei naudotas vanduo vietoje RNR mėginio; teigiamai kontrolei naudotas žinomo RNR integralumo (RIN) RNR mėginys (RIN = 10). Paruošti mėginiai kaitinti 70°C temperatūroje 5 min., po to mikromėgintuvėliai greitai perkelti į šaldomąjį stovelį. Į paruoštą gelį įnešti visi mėginiai (po 10 µL RNR mėginių ir 4 µL RNR ilgio standarto su elektroforezės dažų). Elektroforezė vykdyta 1 valandą esant 100 V įtampai. Praėjus elektroforezei RNR fragmentai fotografuoti UV šviesoje (365 nm bangos ilgis) naudojant gelių dokumentavimo sistemą *MiniBUS Pro*.

### 2.2.8 Kopijinės DNR generavimas, amplifikacija ir realaus laiko PGR

Kopijinės DNR (kDNR) buvo susintetinta atvirkštinės transkripcijos metu iš išskirtos 23 ng RNR, pagal gamintojo rekomendacijas (Thermofisher). Į kiekvieną mėginį paimama 12 µl kDNR mišinio, pridedant 25 ng RNR. Mėginiai trumpai centrifuguojami, atliekama atvirkštinė transkripcija termocikleryje (2.3 lentelė)

**2.3 lentelė** kDNR žingsniai

Žingsnis	Temperatūra	Laikas	Ciklai
<b>Uracilo–DNR glikozilazės inkubacija</b>	50 °C	2 min.	1
<b>Fermentų aktyvacija</b>	95 °C	20 sek.	1
<b>kDNR ardymas</b>	95 °C	1 sek.	40
<b>Pradmenų prisijungimas ir prailginimas</b>	60 °C	20 sek.	

Norint atlikti tikro laiko PGR buvo ruošiami genų pradmenų tirpalai. Mikrocentrifuginiame mėgintuvėlyje įpilta 5 µl atvirkštinio pradmens tirpalas ir 5 µl į priekį orientuoto pradmio (2.4 lentelė). Į mėgintuvėlį pripilta 40 µl H<sub>2</sub>O. Mėgintuvėlis švelniai sumaišytas, kad gerai pasisikirstytų turinys, kelis kartus supipetuotas.

**2.4 lentelė.** Pradmenų sekos

Pradmuo	Tiesioginė seka	Atvirkštinė seka
KRAS-A	5'-AGATGTGCCTATGGTCCTGGTAG-3'	5'-CAATCTGTACTGTCCGATCTCTCTC-3'
KRAS-B	5'-GATGTGCCTATGGTCCTGGTAG-3'	5'-CATCGTCAACACCCTGTCTTG-3'
EGFR	5'-AACACCCTGGTCTGGAAGTACG-3'	5'-TCGTTGGACAGCCTTCAAGAC-3'
FBXW7	5'-GTTTGGTCAGCAGTCACAGGCA-3'	5'-CCACACTTTGAGTGTCCGATCTG-3'
MAML1	5'-GCAACAGCAGTTCCTTCAGAGG-3'	5'-GTGAACTGTCCAACCTGCTGTG-3'
VIM	5'-CCTTGAACGCAAAGTGGAATC-3'	5'-GACATGCTGTTCTGAATCTGAG-3'
CADH1	5'-ATTTTTCCCTCGACACCCGAT-3'	5'-TCCCAGGCGTAGACCAAGA-3'
18s	5'-ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA-3'	5'-GCCTCACTAAACCATCCAATCGG-3'

Toliau trims 96 šulinėlių plokštelėms buvo ruošiamas SYBR Green mišinys. Į atskira 1 ml mėgintuvėlį įpilta 136,9 µl H<sub>2</sub>O (3,7 µl – 1 reakcijai), įpilta 185 µl SYBR green 1x (5 µl – 1 reakcija ir 11,1 µl (0,3 µl – 1 reakcija) pradmenų mišinio. Viskas švelniai sumaišyta ir supipetuota, beti trumpai nucentrifuguota, kad būtų surinkti lašeliai nuo mėgintuvėlio sienelių.

Supilsčius 96 šulinėlius plokštelė buvo užklijuota specialia PGR reakcijoms skirta lipnia plėvele. Prieš paleidžiant realaus laiko PGR reakciją plokštelė buvo nucentrifuguota 1000 x g 1 min. Reakcijos nustatymams suprogramuoti buvo laikytasi gamintojo rekomendacijų *QuantStudio* sistemai (2.3 lentelė).

Kiekvienoje plokštelėje buvo 8 genų trys techniniai pakartojimai. Iš visų genų, 18s buvo „namų ruošos“ genai (angl. *housekeeping genes*) ir 6 EMT genai (2.4 lentelė). 2D ląstelių kultūrų tyrimui vienoje plokštelėje buvo pilstomas vienas iš techninių pakartojimų kontrolei (neveiktų ląstelių RNR) ir vienas techninis pakartojimas poveikiui (siRNR ir anti-EGFR doze paveiktų ląstelių RNR). Taip supilstytos šešios plokštelės, po dvi kiekvienai ląstelių linijai. Viena plokštelė su dviem techniniais pakartojimais.

Ct verčių nustatymas: ciklo slenksčio (Ct) reikšmės, kurios parodo ciklo skaičių, kai fluorescencinis signalas pasiekia tam tikrą slenkstį, buvo užregistruotos ir tiksliniams genams, ir etaloniniam genui.

Santykinės raiškos apskaičiavimas: Santykiniai genų raiškos lygiui apskaičiuoti buvo naudojamas  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  metodas.

Pirma,  $\Delta Ct$  vertė buvo nustatyta atimant kontrolinio geno Ct vertę iš kiekvieno mėginio tikslinio geno Ct vertės. Tada  $\Delta\Delta Ct$  vertė buvo gauta atėmus kontrolinio mėginio  $\Delta Ct$  vertę iš kiekvieno paveikto mėginio  $\Delta Ct$  vertės. Galiausiai, santykinis kiekvieno geno raiškos lygis poveikio mėginiuose buvo apskaičiuotas pakėlus 2 laipsniu iki neigiamos  $\Delta\Delta Ct$  vertės:

$$\Delta Ct = Ct (\text{tiriamasis genas}) - Ct (\text{„namų ruošos“ genas})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tiriamasis genas}) - \Delta Ct (\text{„namų ruošos“ genas})$$

$$\text{Genų raiška kartais (FC, angl. fold change)} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

Genų raiška buvo laikoma reikšmingai pakitusi, kai  $|\log_2 FC| \geq 1$ .

## 2.2.9 Statistinė analizė ir skaičiavimai

Norint nustatyti skirtumų tarp poveikio ir kontrolinių grupių reikšmingumą, buvo atlikta statistiniai testai. Patikrinus duomenų normalumą, naudota dispersijos analizė (ANOVA) ir post-hoc *Tukey* testai. Eksperimentus sudarė du biologiniai pakartojimai, kurių kiekvieną sudaro trys techniniai pakartojimai. Genų raiškos tyrimas buvo sutelktas į septynis genus (*KRAS*, *EGFR*, *VIM*, *MAML1*, *CDH1*) dviejose ląstelių linijose (MCF-7, MDA-MB-231) ir tris poveikio sąlygas (anti-EGFR, siRNR-KRAS-A, siRNR-KRAS-B), įskaitant kontrolinę grupę, genai suklasterizuoti hierarchinio klasterizavimo metodu ir pavaizduoti *heatmap*. Statistiškai reikšmingais skirtumai laikyti, kai  $p < 0,05$ .

Skaičiavimams ir rezultatų grafikams kurti naudotos Microsoft Office Excel 365 (Microsoft Corporation, JAV), ImageJ (su Java 1.8.0), Python 12.0 (StatSoft, JAV) programinės įrangos, parašytas kodas pateikiamas priede nr. 1..



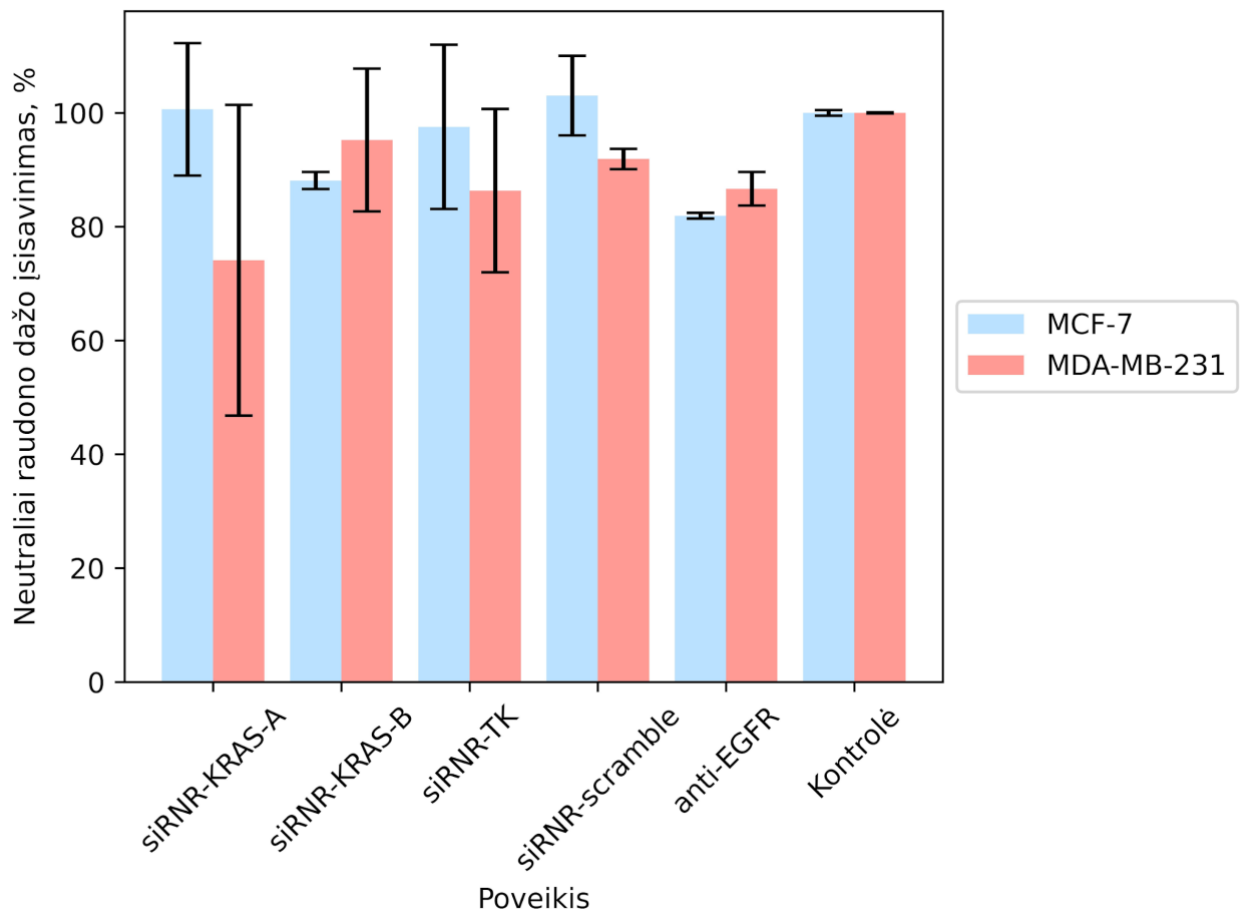
### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Ląstelių kultūrų gyvybingumo tyrimas

Šiame tyrime skirtingiems poveikiams buvo vertinamas citotoksinis poveikis dviem krūties vėžio ląstelių linijoms MDA-MB-231 ir MCF-7 po 24 valandų. Tyrimas apėmė siRNR-KRAS-A ir siRNR-KRAS-B, siRNR teigiamą kontrolę (TK), siRNR neigiamą kontrolę (scramble), anti-EGFR prieš *EGFR* ir kontrolinę grupę. Ląstelės buvo veiktos siRNR, kurios koncentracija buvo 10 pM, ir anti-EGFR, kurios koncentracija buvo 2 μM. Tada ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas naudojant neutraliai raudono dažo testą, kolorimetrinį metodą, pagrįstą gyvybingų ląstelių gebėjimu įtraukti ir surišti supravitalinį dažą į lizosomas.

MDA-MB-231 ląstelių linijoje siRNR-KRAS-A parodė reikšmingiausią citotoksinį poveikį, o ląstelių gyvybingumas siekė ~74 %, palyginti su kontroline grupe. Kita vertus, siRNR-KRAS-B buvo mažiau citotoksiška, o gyvybingumas siekė ~95 %. Kiti poveikiai, įskaitant siRNR teigiamą kontrolę, siRNR neigiamą kontrolę ir anti-EGFR, ląstelių gyvybingumo procentas buvo atitinkamai maždaug 86 %, 92 % ir 87 %.

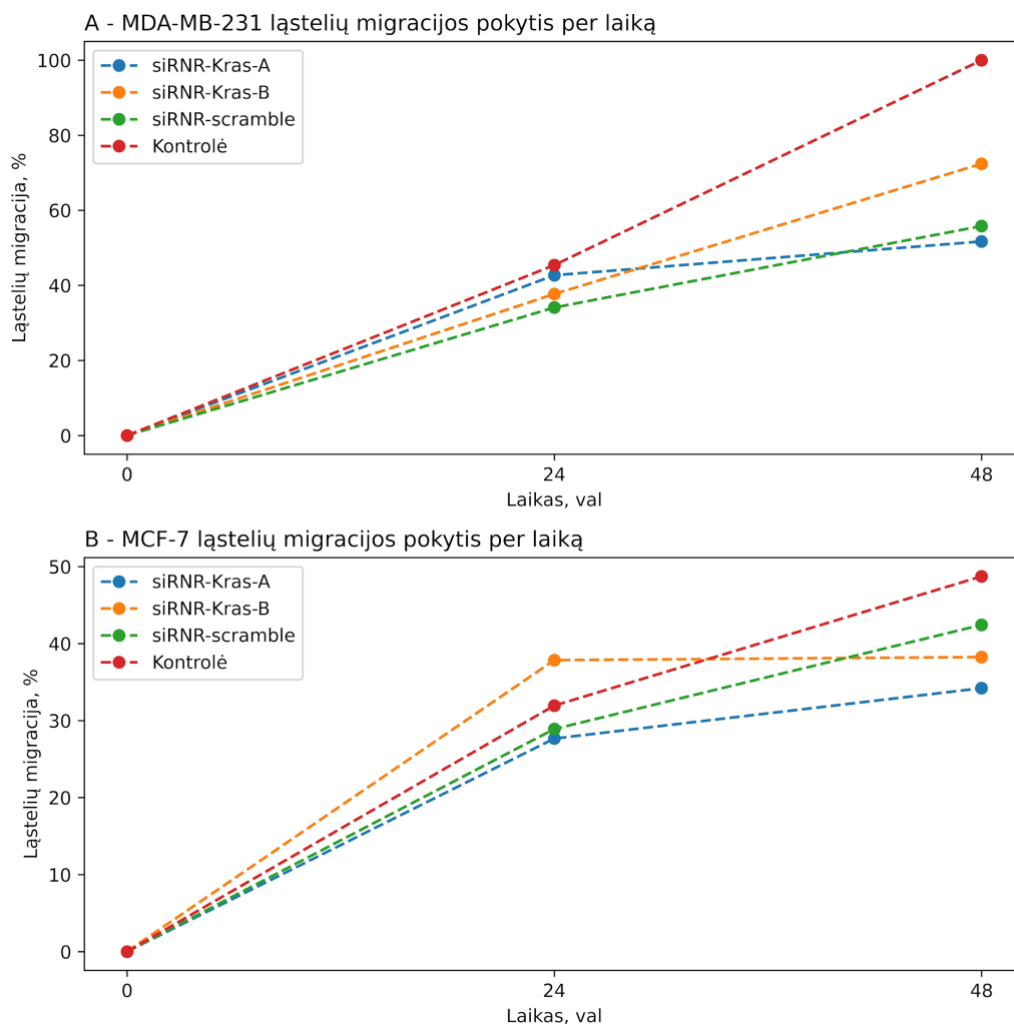
MCF-7 ląstelių linija parodė didžiausią ląstelių gyvybingumą esant siRNR-KRAS-A ~100 %. Jis taip pat pasižymėjo didesne tolerancija siRNR-KRAS-B, siRNR teigiamą kontrolę ir anti-EGFR, o ląstelių gyvybingumo procentas buvo atitinkamai ~88 %, ~98 % ir ~82 %. Neigiamą siRNR kontrolę (toliau - siRNR-scramble) turėjo nereikšmingą poveikį ląstelių gyvybingumui 103 %.



**3.1 pav.** Neutraliai raudono spalvos dažo citotoksiškumo tyrimas. Tiriamosios grupės: siRNR-KRAS-A ir siRNR-KRAS-B, siRNR teigiamą kontrolę (TK), siRNR neigiamą kontrolę (scramble), anti-EGFR ir kontrolinę grupę. Raudona spalva – MDA-MB-231 ląstelės, mėlyna – MCF-7. Grafike pažymėti SD; 3 biologiniai ir 3 techniniai pakartojimai

### 3.2 Ląstelių migracijos tyrimas

Šiame tyrime buvo įvertinta migracija, taikant skirtingą poveikį dviejų krūties vėžio ląstelių linijų, MDA-MB-231 ir MCF-7, migracijai per 24 ir 48 valandas (3.2 pav.). Tyrimas apėmė siRNR-Kras-A, siRNR-Kras-B, siRNR-skramble ir kontrolinę grupes. Matoma tendencija, rodanti sparčiausią „žaidos“ užsitraukimą tiek MCF-7, tiek MDA-MB-231 kontrolinėse grupėse, lyginant su poveikiu.



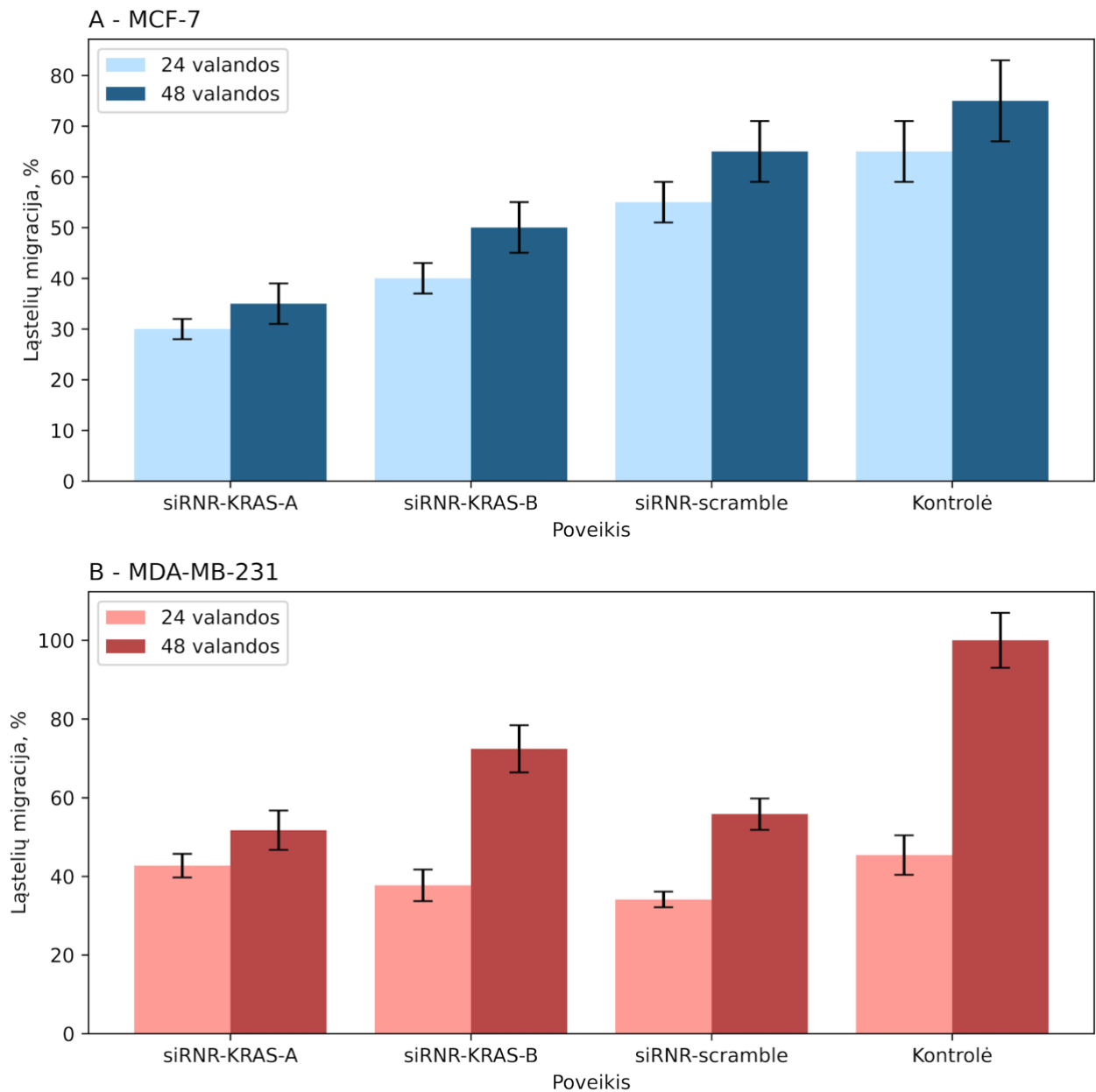
**3.2 Pav.** Krūties navikinių ląstelių migracijos pokytis per 24 ir 48 val. **A** – MDA-MB-231 linija, paveikta siRNR-KRAS-A, siRNR-KRAS-B, siRNR-scramble bei ląstelės be poveikio (kontrolė). **B** – MCF-7 linija, paveikta siRNR-KRAS-A, siRNR-KRAS-B, siRNR-scramble bei ląstelės be poveikio (kontrolė)

MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių migracija buvo įvertinta per laiko taškus, 24 ir 48 valandas (3.3 pav.).

MCF-7 ląstelių (3.3 pav. A) migracijos pokytis nuo „žaizdos“ padarymo siRNR-KRAS-A buvo  $30 \pm 2$  % po 24 val. ir šiek tiek padidėjo iki  $35 \pm 4$  % po 48 val. Ląstelių veiktų siRNR-KRAS-B migracija padidėjo nuo  $40 \pm 3$  % per 24 val. iki  $50 \pm 5$  % po 48 val.. Poveikis siRNR-scramble mažiau slopino ląstelių migraciją ir buvo stebimas pokytis nuo  $55 \pm 4$  % po 24 val. iki  $65 \pm 6$  % po 48 val.. Kontroliniame mėginyje ląstelių migracija siekė  $65 \pm 6$  % po 24 val. ir toliau padidėjo iki  $75 \pm 8$  % po 48 val..

MDA-MB-231 ląstelių linijoje (3.3 pav. B) migracijos procentas veikiant siRNR-KRAS-A buvo  $43 \pm 3$  % po 24 val., o po 48 val. padidėjo iki  $52 \pm 5$  %. Po poveikio siRNR-KRAS-B,

pastebimas ląstelių migracijos padidėjimas nuo  $38 \pm 4$  % per 24 val. iki  $72 \pm 6$  % po 48 val. Na, o siRNR-scramble migracija kito nuo  $34 \pm 2$  % po 24 val. iki  $56 \pm 4$  % po 48 val. Kontroliniame mėginyje „žaisda“ pilnai užsitraukė, t.y., ląstelių migracija nuo  $45 \pm 5$  % po 24 val. pasiekė  $100 \pm 7$  % po 48 val.



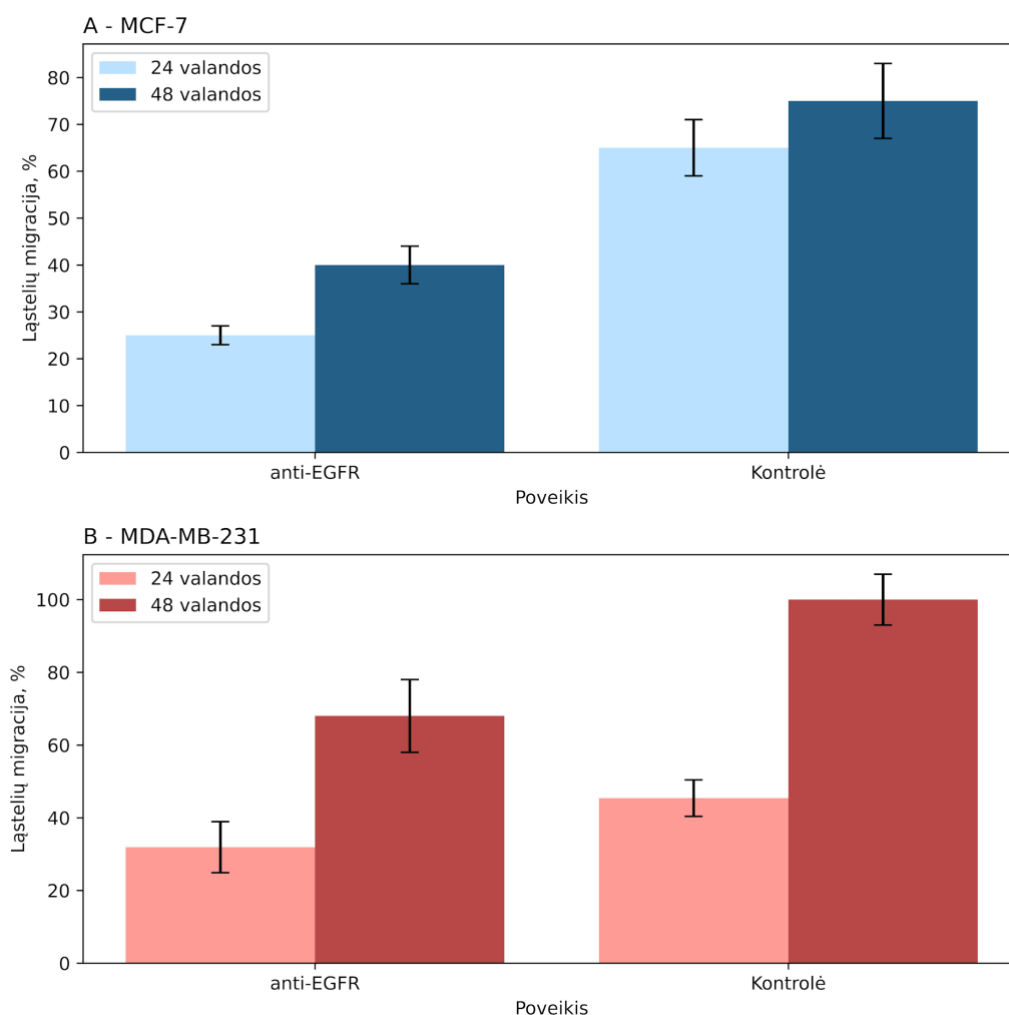
**3.3 pav.** Migracijos pokytis per laiką. **A** – MDA-MB-231 ląstelių linijos pokytis po 24 val. ir 48 val., **B** – MCF-7 ląstelių linijos pokytis po 24 val. ir 48 val.

Toliau ištirtas anti-EGFR poveikis ląstelių migracijai dviejuose skirtinguose ląstelių tipuose: MCF-7 (3.4 pav. -) ir MDA-MB-231 (3.5 pav. B). Poveikis anti-EGFR, buvo lyginamas su

kontroline grupe. Ląstelių migracija buvo stebima dviem laiko taškais: 24 valandas ir 48 valandas po poveikio.

MCF-7 ląstelių (3.4 pav. A.) poveikis anti-EGFR parodė ląstelių migracijos sumažėjimą, palyginti su kontroline grupe, ir po 24 valandų ( $25 \pm 2$  %) ir po 48 valandų ( $40 \pm 4$  %). Panaši tendencija buvo pastebėta MDA-MB-231 ląstelėse (3.4 B pav.), kur anti-EGFR veiktos grupės ląstelių migracija sumažėjo po 24 valandų ( $32 \pm 7$  %) ir po 48 valandų ( $68 \pm 10$  %), palyginti su kontroline grupe. grupe.

Tačiau abiejų tipų ląstelėse ląstelių migracija padidėjo nuo 24 iki 48 valandų. MCF-7 ląstelėse migracija padidėjo nuo 25 % po 24 valandų iki 40 % po 48 valandų, veikiant anti-EGFR, ir panašus padidėjimas buvo pastebėtas MDA-MB-231 ląstelėse – nuo 32 % iki 68 %. Kontrolinės grupės taip pat parodė, kad laikui bėgant padidėjo abiejų tipų ląstelių migracija.



**3.4 pav.** Migracijos pokytis per laiką. **A** – MDA-MB-231 ląstelių linijos pokytis po 24 val. ir 48 val., **B** – MCF-7m ląstelių linijos pokytis po 24 val. ir 48 val.

Kaip matoma 3.1 lentelėje, skirtingas poveikis MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijoms buvo įvertintas naudojant ANOVA testą. Skirtumas, tiriant ląstelių linijų poveikis buvo statistiškai reikšmingas visomis poveikio sąlygomis (anti-EGFR:  $p = 0,0002$ ; si-RNR-KRAS:  $p < 0,0001$ ; anti-EGFR ir si-RNR-KRAS:  $p < 0,0001$ ).

Tiriant anti-EGFR slopinimo poveikį migracijai, jis abejoms ląstelių linijoms buvo reikšmingas ( $p = 0,929$ ). Šiek tiek mažesnis, tačiau vis tiek statistiškai reikšmingas rezultatas pastebėtas veikiant su si-RNR-KRAS-A arba si-RNR-KRAS-B ( $p = 0,003$ ). Taip pat, pastebėtas pokytis tarp slopinimo būdų ( $p = 0,01$ ).

Laikas taip pat turėjo statistiškai reikšmingą įtaką visomis tyrimo sąlygomis (anti-EGFR:  $p = 0,002$ ; si-KRAS:  $p < 0,0001$ ; taikant anti-EGFR arba si-KRAS:  $p = 0,0002$ ).

Tačiau sistemos poveikis tarp ląstelių linijos, taikyto slopinimo poveikio ir laiko nebuvo statistiškai reikšmingas.

**Lentelė 3.1** ANOVA lentelė migracijos pokyčio įvertinimui tarp poveikio ir ląstelių linijų anti-EGFR

<b>Kintamasis</b>	<b>laisvės laipsnis</b>	<b>F</b>	<b>PR(&gt;F)</b>
Ląstelių linija	1	23,721	0,000
Poveikis	1	11,03	0,000
Laikas	1	13,364	0,002
Triukšmas	16		

siRNR-KRAS

<b>Kintamasis</b>	<b>laisvės laipsnis</b>	<b>F</b>	<b>PR(&gt;F)</b>
Ląstelių linija	1	263,904	0,000
Poveikis	2	7,385	0,003
Laikas	1	23,758	0,000

anti-EGFR ir siRNR-KRAS-A arba siRNR-KRAS-B

<b>Kintamasis</b>	<b>laisvės laipsnis</b>	<b>F</b>	<b>PR(&gt;F)</b>
Ląstelių linija	1	147,991	0,000
Poveikis	2	5,656	0,010
Laikas	1	18,615	0,000
Triukšmas	24		

Apibendrinant galima pasakyti, kad ląstelių linijos tipas ir laiko taškai turėjo reikšmingą poveikį, tačiau gydymo tipas buvo reikšmingas tik si-KRAS ir kombinuotam požiūriui, o ne vien anti-EGFR. Tarp šių kintamųjų reikšmingos sąveikos nebuvo.

### **3.3 Genų raiškos pokyčiai po poveikio siRNR-KRAS-A, siRNR-KRAS-B bei anti-EGFR**

Išskyrus RNR (priedas nr. 2) buvo atliekama lyginamoji genų raiškos analizė MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijose, paveiktose anti-EGFR arba siRNR-KRAS-A, siRNR-KRAS-B. Kaip matoma 3.5 pav. rezultatai buvo lyginami su kontroline grupe, kiekvienai ląstelių linijai, siekiant įvertinti santykinius genų raiškos pokyčius. Santykiniams reikšmingiems genų raiškos pokyčiams nustatyti buvo apskaičiuotos  $\log_2$  FC ir  $1/FC$  reikšmės =  $\pm 1$ , kurios rodo raišką kartais,

lyginant su kontroliniu genu. Tiriamieji genai buvo Kristen žiurkės sarkomos virusas (*KRAS*, angl. Kristen rat sarcoma virus), *EGFR*, F-Box ir WD besikartojimo domenas 7 (*FBXW7*, angl. F-Box And WD Repeat Domain Containing 7), vimentinas (*VIM*, angl. vimentin), į Mastermind panašus Transkripcijos koaktyvatorius 1 (*MAML1*, angl. į Mastermind Like Transcriptional Coactivator 1), kadherinas (*CDH1*, angl. cadherin 1)

*MCF-7 ląstelių linijos pokyčiai:*

Veikimas siRNR-KRAS-A (3.3 pav. A) slopino *KRAS-A* transkripto raišką ( $\log_{2}FC < -1$ ). *EGFR*, *FBX7*, o *VIM*, *MAML1* ir *CDH1* genų raiška padidėjo ( $\log_{2}FC > 1$ ), o veikimas siRNR-KRAS-A neturėjo įtakos vienodo slopinimo *KRAS-B* raiškai.

Veikimas siRNR-KRAS-B (3.3 pav. B) tikslingai sumažino *KRAS-B* raiškos sumažėjimą ( $\log_{2}FC < -1$ ). Taip pat *EGFR* ir *CDH1* genų raiškos lygiai buvo žymiai sumažėję ( $\log_{2}FC < -1$ ). O *KRAS-A*, *FBXW7*, *VIM* raiška padidėjo ( $\log_{2}FC > 1$ ). Pažymėtina, kad *MAML1* ir *EGFR* raiška išliko palyginti nepakitusi veikiant siRNA-KRAS-B.

Veikimas anti-EGFR (3.3 pav. E) lėmė reikšmingą *EGFR* raiškos sumažėjimą ( $\log_{2}FC < -1$ ), patvirtinantį antikūno veiksmingumą nukreipiant į šį receptorių. Be to, *FBXW7*, *VIM* ir genų raiška pastebimai sumažėjo ( $\log_{2}FC < -1$ ). O *KRAS-B* ir *MAML1* raiška padidėjo ( $\log_{2}FC > 1$ ).

*MDA-MB-231 ląstelių linijos pokyčiai:*

Veikimas siRNR-KRAS-A (3.3 pav. C) nereikšmingai sumažino *KRAS-A* raišką. Taip pat, *EGFR*, *FBXW7* ir *CDH1* genų raiška sumažėjo ( $\log_{2}FC < -1$ ), o *KRAS-B*, *VIM* ir *MAML1* pokyčių raiškoje nepastebėta.

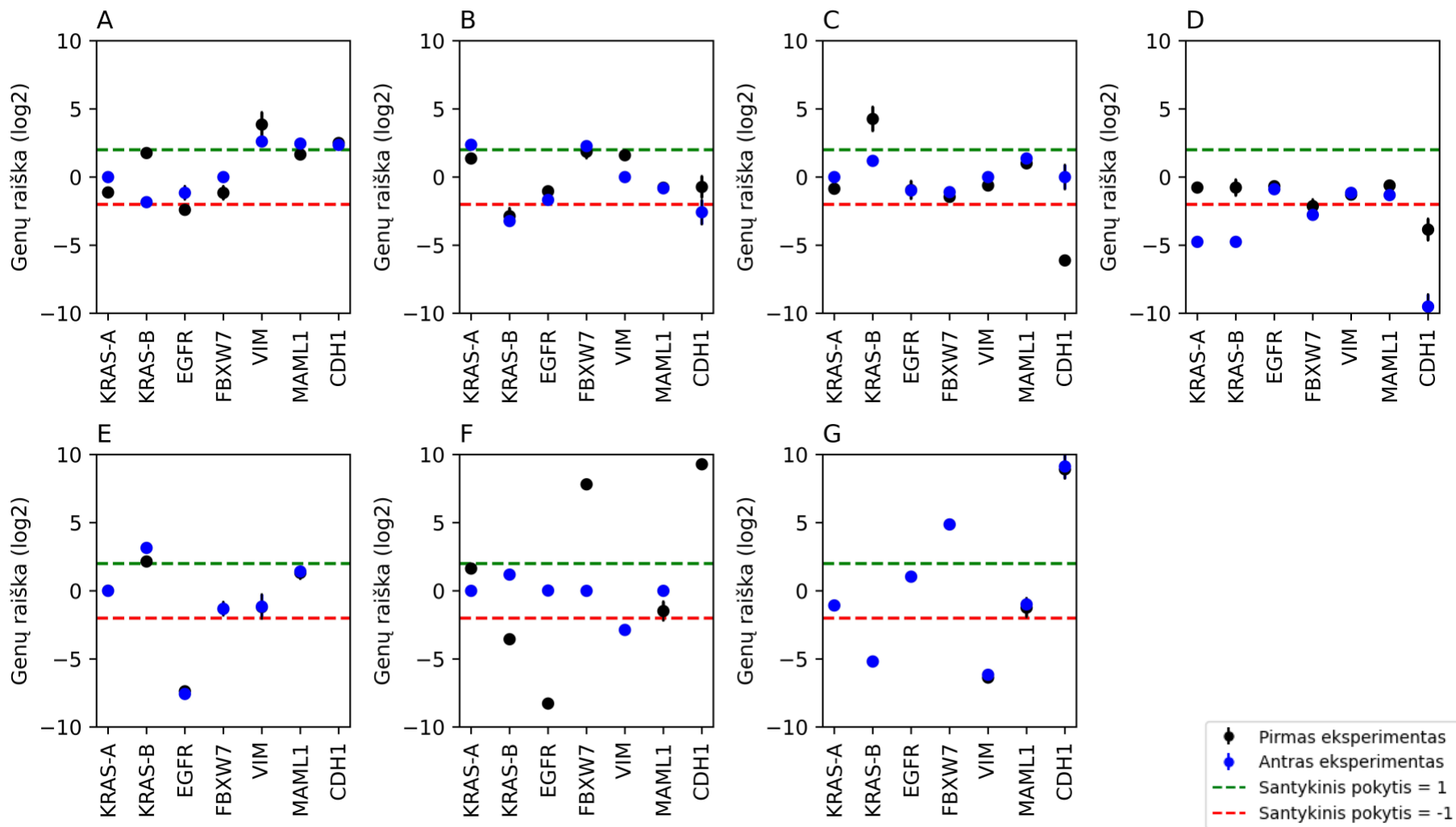
Toliau veikiant siRNR-KRAS-B (3.3 pav. D) pastebėtas reikšmingas *KRAS-B* raiškos sumažėjimą ( $\log_{2}FC < -1$ ). Taip pat, reikšmingai sumažėjo *FBXW7*, *MAML1*, *VIM*, *CDH1* genų raiškos lygiai ( $\log_{2}FC < -1$ ). Reikšmingų pokyčių *EGFR* raiškoje nepastebėta.

anti-EGFR (3.3 pav. F) reikšmingai sumažino *EGFR* raišką ( $\log_{2}FC < -1$ ), patvirtindamas antikūno specifiškumą savo taikiniui. *KRAS-B*, *VIM* ir *MAML1* genų raiška lygiai žymiai sumažėjo ( $\log_{2}FC < -1$ ). *KRAS-A* raiška šiek tiek išaugo ( $FC > 1$ ), o reikšmingų *FBXW7* ir *MAML1* genų raiškos pokyčių nepastebėta.

*Kontrolių genų raiškos skirtumai, skirtingose ląstelių linijose:*

Ištirti genų raiškos lygiai tarp MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijų. MCF-7 ląstelės pasižymėjo didesne *KRAS-A*, *VIM*, *MAML1* ir *CDH1* raiška, palyginti su MDA-MB-231 ląstelėmis. Ir atvirkščiai, MDA-MB-231 ląstelės parodė didesnę *EGFR*, *FBX17* ir *CDH1* raišką.





**3.5 pav.** Genų *KRAS-A*, *KRAS-B*, *EGFR*, *FBXW7*, *VIM*, *MAML1*, *CDH1* raiškos pokytis kartais (log<sub>2</sub>), po skirtingo slopinimo metodo navikėnėse ląstelių linijose. **A** – MCF-7, veikta siRNR-KRAS-A; **B** – MCF-7, veikta siRNR-KRAS-B; **C** – MDA-MB-231, veikta siRNR-KRAS-A; **D** – MDA-MB-231, veikta siRNR-KRAS-B; **E** – MCF-7, veikta anti-EGFR; **F** – MDA-MB-231, veikta anti-EGFR; **G** – MCF-7 kontrolės palyginimas su MDA-MB-231 kontrole

Vizualizuoti *KRAS-A*, *KRAS-B*, *EGFR*, *FBXW7*, *VIM*, *MAML1* ir *CDH1* genų raiškos lygiai dviejose krūties vėžio ląstelių linijose (MCF-7 ir MDA-MB-231) po skirtingų slopinimo būdų (siRNR-*KRAS-A*, siRNR-*KRAS-B* ir anti-EGFR) matomi *heatmap* (3.6 pav.).

Tiek MCF-7, tiek MDA-MB-231 ląstelių linijose *KRAS-A* geno raiška sumažėję po visų poveikio būdų, lyginant su kontrole. Didžiausias raiškos buvo pastebėtas taikant siRNA-*KRAS-B* MDA-MB-231 ląstelių linijoje.

Panašiai kaip ir *KRAS-A* atveju, *KRAS-B* geno raiška sumažėjo, reaguojant į visus abiejų ląstelių linijų poveikius, o didžiausias raiškos sumažėjimas pastebėtas MDA-MB-231 ląstelių linijoje po poveikio siRNA-*KRAS-B* ir anti-EGFR.

*EGFR* geno raiška sumažėjo, esant visom slopinimo sąlygomis abiejose ląstelių linijose. Šis sumažėjimas buvo reikšmingiausias naudojant anti-EGFR, o tai rodo šio metodo veiksmingumą slopinant EGFR raišką.

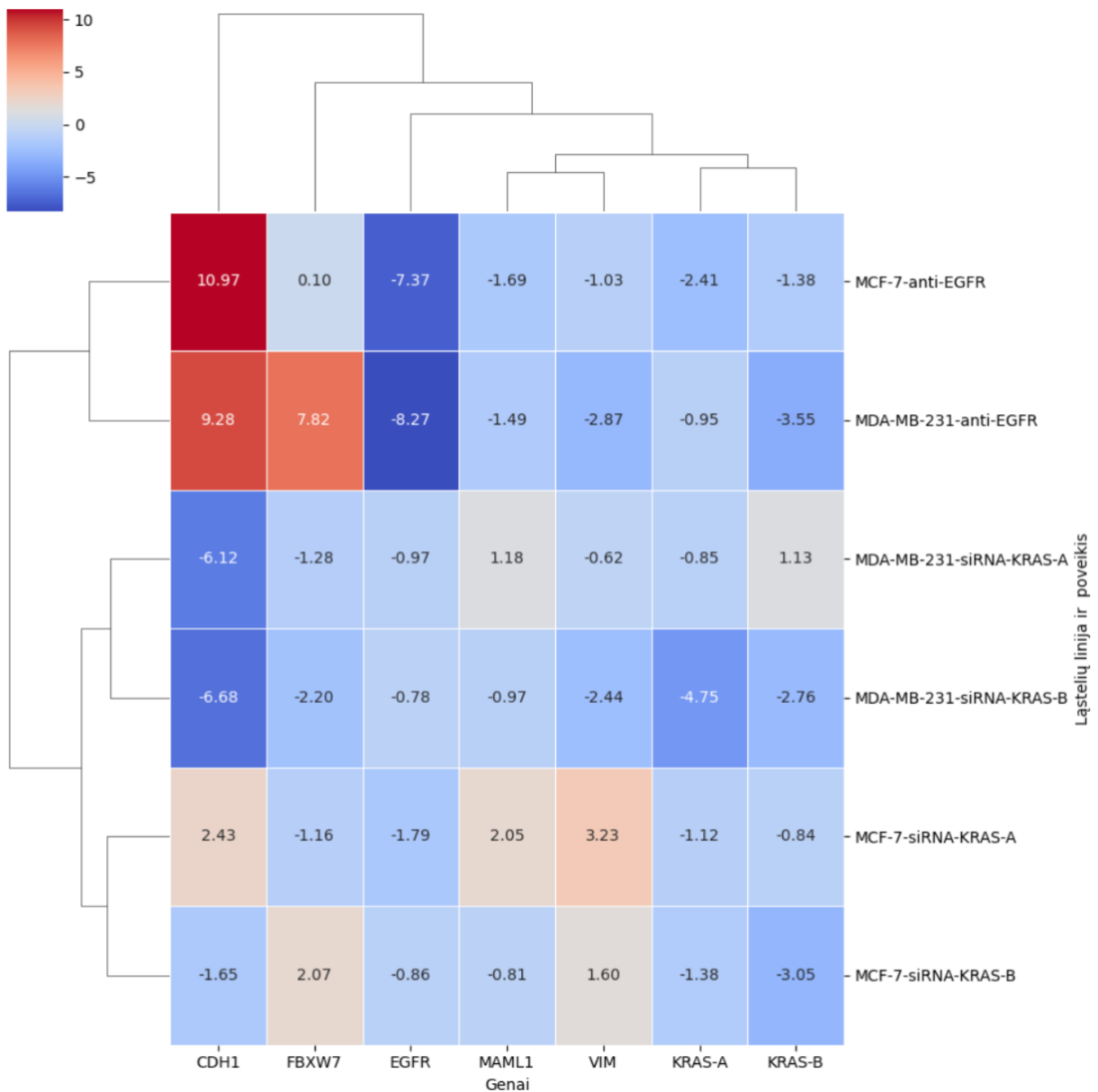
*FBXW7* atveju raiška kito skirtingai. MCF-7 ląstelių linijoje naudojant siRNA-*KRAS-B* išaugo šio geno raiška. Priešingai, MDA-MB-231 ląstelių linijoje pastebėtas *FBXW7* raiškos sumažėjimas po poveikio siRNA-*KRAS-A* ir siRNA-*KRAS-B*. Naudojant anti-EGFR *FBXW7* raiška padidėjo MDA-MB-231 ląstelių linijoje.

*VIM* raiška padidėjo MCF-7 ląstelių linijoje po poveikio siRNA-*KRAS-A* ir siRNA-*KRAS-B*. MDA-MB-231 ląstelių linijoje visi slopinimo būdai sumažino *VIM* raišką, ypač veikiant siRNA-*KRAS-B* ir anti-EGFR.

*MAML1* geno raiška šiek tiek sumažėjo po poveikio siRNA-*KRAS-B* ir anti-EGFR abiejose ląstelių linijose, o slopinimas siRNA-*KRAS-A* turėjo nedidelį teigiamą poveikį jo raiškai.

*CDH1* geno ekspresija pastebimai sumažėjo MDA-MB-231 ląstelių linijoje po poveikio siRNA-*KRAS-A* ir siRNA-*KRAS-B*. MCF-7 ląstelių linijoje po poveikio anti-EGFR buvo pastebėtas vidutinis *CDH1* raiškos padidėjimas.

Visi šie rezultatai rodo, kad specifinių tildymo būdų poveikis genų raiškai yra būdingas genams ir ląstelių linijoms. Tokie skirtingi atsakymai iliustruoja sudėtingą genų reguliavimo tinklų dinamiką įvairiuose ląstelių kontekstuose. Būtina atlikti tolesnius tyrimus, siekiant išsiaiškinti tikslius mechanizmus, kuriais grindžiami šie stebėjimai, ir patvirtinti šiuos rezultatus platesniame navikogenezės kontekste.



**3.6 pav.** *KRAS-A*, *KRAS-B*, *EGFR*, *FBXW7*, *VIM*, *MAML1* ir *CDH1*) raiškos lygius krūties vėžio ląstelių linijose MCF-7 ir MDA-MB-231 po skirtingų tildymo būdų (siRNR-*KRAS-A*, siRNR-*KRAS-B* ir anti-*EGFR*). Raiškos pokytis pavaizduotas spalvų gradientu, raudona rodo padidėjusią genų raišką, o mėlyna - sumažėjusią.

Apskritai *heatmap* iliustruoja, skirtingų poveikius ir suteikia vertingų įžvalgų apie galimą genų klasterizavimą. Toliau buvo atlikta ANOVA, siekiant patikrinti genų raiškos skirtumus įvairiuose slopinimo metoduose. Be to, siekiant nustatyti skirtumus tarp grupių, buvo atliktas Tukey post hoc testas.

Geno *KRAS-A*  $p=0,645$ , o tai rodo, kad nebuvo reikšmingo skirtumo tarp slopinimo būdų. Taigi post hoc testas nebuvo atliktas.

*KRAS-B* atveju  $p = 0,011$ , o tai rodo reikšmingą skirtumą tarp tildymo būdų. Be to, *Tukey* testas atskleidė reikšmingus skirtumus tarp kontrolinės ir anti-EGFR grupių ( $p=0,016$ ) bei kontrolinės ir siRNA-*KRAS-B* grupių ( $p = 0,012$ ).

Panašiai, *EGFR*, *FBXW7*, *MAML1* ir *CDH1* atveju ANOVA testas parodė reikšmingus skirtumus tarp skirtingų gydymo būdų ( $p < 0,05$ ). *Tukey* testu nustatyta kad anti-EGFR slopinimas grupė skyrėsi nuo kitų slopinimo grupių ( $p < 0,05$ ). *VIM* atveju ANOVA testas nerodė reikšmingo skirtumo tarp gydymo būdų ( $p = 0,445$ ). Todėl post hoc testas nebuvo atliktas.

**Lentelė 3.2** ANOVA ir post-hoc *Tukey* statistinės analizės rezultatai. Po ANOVA analizės gauti reikšmingi pokyčiai ( $p < 0.05$ ), toliau buvo analizuojami post-hoc testu *Tukey* testas.

<b>Genas</b>	<b>p-reikšmė (ANOVA)</b>	<b>Slopinimo palyginimas</b>	<b>p-reikšmė (<i>Tukey</i> testas)</b>
<i>KRAS-A</i>	0.645	-	-
<i>KRAS-B</i>	0.011	kontrolė-anti-EGFR	0.016
		kontrolė-siRNA- KRAS-B	0.012
<i>EGFR</i>	0.000	kontrolė-anti-EGFR	0.001
		anti-EGFR - siRNA- KRAS-A	0.000
		anti-EGFR - siRNA- KRAS-B	0.000
<i>FBXW7</i>	0.022	kontrolė - siRNA- KRAS-A	0.024
		kontrolė - siRNA- KRAS-B	0.031
<i>VIM</i>	0.445	-	-
<i>MAML1</i>	0.001	kontrolė-anti-EGFR	0.001
		anti-EGFR - siRNA- KRAS-A	0.002
		kontrolė - siRNA- KRAS-B	0.001
		siRNA-KRAS-A - siRNA-KRAS-B	0.005
<i>CDH1</i>	0.002	kontrolė-anti-EGFR	0.018
		kontrolė - siRNA- KRAS-A	0.003
		kontrolė - siRNA- KRAS-B	0.002

Rezultatai rodo, kad skirtingi slopinimo būdai turi skirtingą poveikį genų raiškai. Ypač atrodo, kad gydymas anti-EGFR sukelia esminius kelių genų pokyčius. Tačiau kai kurie genai, tokie kaip KRAS-A ir VIM, neparodė reikšmingų pokyčių slopinimo metu.

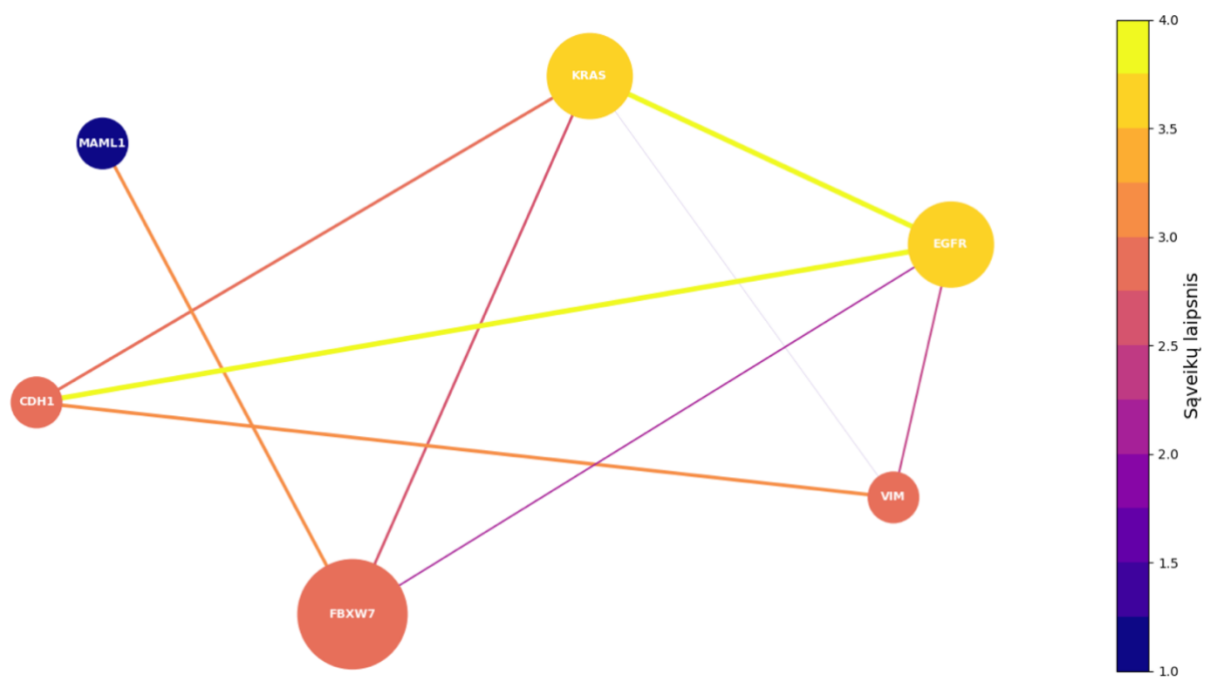
### 3.4 Genų sąveikos tinklo analizė, naudojant STRING duomenų bazę

Genų sąveikos tinkle, sudarytame iš dominančių genų sąrašo, kiekvienas genas (arba jo baltymų produktas) buvo vaizduojamas kaip tinklo mazgas. Kiekvieno geno sąveikų su kitais genais skaičius buvo apskaičiuotas ir diagramoje pavaizduotas kaip mazgo laipsnis.

Mazgo laipsnio analizė atskleidė, kad *KRAS* ir *EGFR* yra labiausiai susiję genai sąrašė, kurių kiekvienas turi keturis ryšius su kitais genais.

Po *KRAS* ir *EGFR* buvo nustatyta, kad *FBXW7*, *VIM* ir *CDH1* turi po tris jungtis. Šie genai, nors ir nėra taip stipriai susiję kaip *KRAS* ir *EGFR*, vis tiek sąveikauja su didele dalimi kitų sąrašė esančių genų, o tai rodo galimą jų reikšmę.

Na, o *MAML1* genas tinkle turi tik vieną ryšį. Nors ir nėra toks tarpusavyje susijęs kaip kiti, jo buvimas tinkle vis tiek rodo funkcinę sąveiką.



**3.7 pav.** Genų sąveikos tinklo vizualizacija STRING duomenų bazėje: *KRAS*, *EGFR*, *FBXW7*, *VIM*, *MAML1* ir *CDH1* sąveikos tyrimas

Svarbu pažymėti, kad tinklo mazgo laipsnis nebūtinai tiesiogiai koreliuoja su jo biologine reikšme ar poveikiu. Aukšto laipsnio mazgai, tokie kaip *KRAS* ir *EGFR*, gali dalyvauti daugelyje

procesų ir taip sąveikauti su daugeliu kitų genų, o žemesnio laipsnio mazgai, tokie kaip *MAMLI*, gali atlikti lemiamą vaidmenį konkretesniame kelyje ar procese.

## 4. REZULTATŲ APTARIMAS

### 4.1 Citotoksiškumo įvertinimas

Neutralios raudonos spalvos tyrimas yra dažnai naudojamas citotoksiškumo įvertinimo metodas. Jis matuoja ląstelių gyvybingumą pagal jų gebėjimą įtraukti ir surišti neutralų raudoną dažą lizosomose. Sveikos ląstelės priims dažus, o pažeistos ar negyvos – ne (Repetto *et al.*, 2008).

MCF-7 ląstelių linijoje siRNR-KRAS-A pasižymėjo didžiausiu citotoksiškumu (mažiausiai įsisavinta neutralios raudonos spalvos dažo), o po jo yra anti-EGFR. Atrodo, kad mažiausiai citotoksinis MCF-7 ląstelių poveikis yra siRNR-*scramble*. MDA-MB-231 ląstelių linijai anti-EGFR poveikis rodo didžiausią citotoksiškumą, po jo-siRNR-KRAS-A. siRNR-*scramble* vėl pasižymėjo mažiausiu citotoksiniu poveikiu.

Šie rezultatai rodo, kad citotoksinis poveikis gali skirtis priklausomai nuo konkrečios ląstelių linijos ir svarbiausia buvo neviršyti ~25 % citotoksiškumo, norint atlikti tolimesnius eksperimentus. Pavyzdžiui, atliktas tyrimas parodė, kad aukso nanodalelės, padengtos trimetilchitozanu, gali sustiprinti siRNR tiekimą ir įsisavinimą krūties vėžio ląstelėse, todėl gali pasireikšti reikšmingas citotoksinis poveikis (Baghani *et al.*, 2022). Kitas tyrimas parodė, kad į EGFR nukreipta liposominė CD73 siRNR gali sustiprinti liposominio doksorubicino priešnavikinį poveikį pelės modeliui (Soleimani *et al.*, 2022).

### 4.2 Migracijos pokytis, veikiant siRNR arba anti-EGFR

Migracija buvo vertinama MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijoms po slopinimo siRNR, nukreiptomis prieš *KRAS* arba anti-EGFR, norint suprasti, kaip šie signaliniai keliai gali prisidėti prie migracijos ir potencialiai metastazuojančio šių krūties navikinių ląstelių elgesio.

MCF-7 ląstelių linijoje siRNR poveikis abiem *KRAS* izoformoms lėmė panašų ląstelių migracijos sumažėjimą, palyginus su kontroline grupe. Tai gali reikšti, kad MCF-7 linija, turinti laukinio tipo *KRAS* geną yra mažiau jautri *KRAS* izoformų reguliavimui arba kad kiti veiksniai yra ryškesni kontroliuojant migraciją šioje ląstelių linijoje (R.-K. Kim *et al.*, 2015).

MDA-MB-231 ląstelių linijoje migracija statistiškai reikšmingai sumažėjo tiek po veikimo slopinant *KRAS* geno raišką su siRNR-KRAS-A, tiek po poveiko su siRNR-KRAS-B, kas atitinka ankstesnius tyrimus, rodančius *KRAS* vaidmenį migracijai ir metastazuojant įvairių tipų vėžiui (Lee

*et al.*, 2021). Tyrime buvo įrodyta, kad per didelė aktyvintos *KRAS* raiška sumažina ląstelių migraciją ir metastastazių susidarymą. Tildant *KRAS-A* pastebėtas mažesnis poveikis migracijai, palyginus su *KRAS-B*. Tai gali reikšti skirtingą *KRAS* izoformų vaidmenį ląstelių migracijoje, nors norint patvirtinti ir išsiaiškinti šį skirtumą, reikėtų atlikti tolesnius tyrimus.

Veikiant anti-EGFR statistiškai reikšmingai buvo slopinama ląstelių migraciją abiejose ląstelių linijose. Tai sutampa su atliktu tyrimu, kuriame nustatyta, kad į EGFR antikūnus nukreiptos nanodalelės slopina nuo EGFR priklausomą migraciją (Roncato *et al.*, 2018).

Tarp šių skirtingų slopinimo sistemų rastas nedidelis statistinis reikšmingumas, kas galėtų parodyti, jog kompleksinis taikymas būtų tikslingas, norint paveikti navikinių ląstelių migraciją.

### 4.3 Genų raiška po siRNR arba anti-EGFR

Genų raiškos rezultatai parodo skirtingus molekulinis profilius lyginant MCF-7 ir MDA-MB-231 ląstelių linijas po veikimo siRNA-KRAS-A, siRNA-KRAS-B ir anti-EGFR tiriant *KRAS*, *EGFR*, *FBXW7*, *VIM*, *MAML1* ir *CDH1* genus. Tikslinių genų reguliavimas naudojant siRNR arba anti-EGFR, turėjo skirtingą poveikį genų raiškos pokyčiams.

Poveikis su siRNA-KRAS-A lėmė bendrą tikslinio geno transkripto *KRAS-A* raiškos sumažėjimą abiejose ląstelių linijose. Šio geno transkripto raiška gali lemti sumažėjusią ląstelių proliferaciją ir padidėjusį išgyvenimą abiejose ląstelių linijose, o tai gali turėti įtakos jų navikinėms savybėms, ką patvirtina ir ankstesni tyrimai (Luo *et al.*, 2021). Įdomu tai, kad slopinant su siRNR-KRAS-A netikslingai nusitildė ir *KRAS-B* izoforma MCF-7 ląstelių linijoje, kuri turi *KRAS* geno laukinį tipą, o tai gali rodyti galimą kryžminį dviejų izoformų veikimą, kuris panašiai veikia ląstelių augimą ir išgyvenimą. Sumažėjusi *EGFR* raiška gali lemti pokyčius, kaip ląstelės reaguoja į augimo signalus. Tai gali turėti įtakos daugeliui procesų, tokių kaip ląstelių dalijimuisi, diferenciacijai. Per didelė *EGFR* raišką yra susijusi su daugybe vėžio formų, įskaitant tam tikras krūties, plaučių ir gaubtinės ir tiesiosios žarnos vėžio rūšis, kaip parodyta ankstesniuose tyrimuose (Maennling *et al.*, 2019). Taigi *KRAS* sukeltas *EGFR* raiškos sumažėjimas gali veikti kaip naviką slopinantis mechanizmas, mažinantis nekontroliuojamą ląstelių augimą ir dalijimąsi. O sumažėjusi *FBXW7* raiška abiejose ląstelių linijose po siRNR-KRAS-A poveikio gali reikšti sumažėjusį ląstelių augimo ir dalijimosi potencialą, atsižvelgiant į jų vaidmenį signaliniuose keliuose, o tyrimuose aptariama, kad *FBXW7* funkcijos praradimas buvo susijęs su atsparumu vaistams sergant tam tikromis vėžio formomis (Fan *et al.*, 2022). Todėl *KRAS* sukeltas *FBXW7* raiškos sumažėjimas gali turėti įtakos atsakui į naviko vystimąsi. Skirtingas raiškos poveikis pasireiškė *VIM*, EMT žymeniui, galintis reikšti skirtingą poveikį ląstelių migracijos potencialui (Usman *et al.*, 2021). MCF-7 pastebėtas



padidėjimas, o MDA-MB-231 sumažėjimas. Kadangi MCF-7 linija turi mažesnį metastazavimo potencialą, *VIM* raiškos išaugimas, galėjo lemti migracijos sumažėjimą (3.3 pav. A). Tai gali skirtingai paveikti šių ląstelių linijų metastazavimo potencialą. *MAMLI* yra transkripcijos koaktyvatorius, kuris, kaip žinoma, atlieka svarbų vaidmenį Notch signaliniame kelyje. Šis kelias yra susijęs su įvairiais procesais, įskaitant ląstelių likimo nustatymą, ląstelių dauginimąsi ir ląstelių mirtį, todėl jis yra būtinas tiek vystymuisi (Edwards & Brennan, 2021). *MAMLI* geno raiška išaugo abiejose ląstelių linijose, kas galėtų reikšti, kad *MAMLI* reguliavimas gali būti kompensacinis atsakas į *KRAS* praradimą. Ląstelė gali bandyti išlaikyti savo signalų pusiausvyrą, sustiprindama Notch kelio aktyvumą. *CDHI* yra esminis genas palaikant normalų epitelio ląstelių elgesį. Jis atlieka pagrindinį vaidmenį ląstelių ir ląstelių adhezijoje, užtikrindamas audinių struktūros ir architektūros palaikymą. *CDHI* reguliavimo sutrikimas buvo susijęs su vėžio progresavimu, ypač EMT, kuris leidžia vėžio ląstelėms įgyti invazinių savybių ir prisidėti prie metastazių (Kroepil *et al.*, 2012). Šio geno raiška taip pat skyrėsi tarp ląstelių linijų. Šiek tiek išaugausi MCF-7 ląstelių linijoje ir gali reikšti EMT slopinimą, o tai gali sukelti mažiau invazinį fenotipą. MDA-MB-231 ląstelių linijoje *CDHI* raiškos sumažėjimas gali reikšti, kad šios ląstelės skirtingai reaguoja į *KRAS* nutildymą, palyginti su MCF-7 ląstelėmis, galbūt dėl jų agresyvesnio, mezenchiminio pobūdžio.

Poveikis siRNR-KRAS-B žymiai sumažino *KRAS-B* raišką abiejose ląstelių linijose, tikslingai veikdamas šį geno transkriptą, didesniu poveikiu pasižymint MDA-MB-231 ląstelių linijoje, kuri turi šio geno mutaciją. EGFR raiška taip pat šiek tiek sumažėjo, kaip ir veikiant su siRNR-KRAS-A. *FBXW7* atsakas šiuo slopinimo būdu buvo skirtingas, priešingai nei tildant su siRNR-KRAS-A: MDA-MB-231 šio išliko buvo taip pat sumažėjusi, o MCF-7 ląstelių linijoje šio geno raiška išaugo, galimai parodant skirtingą *KRAS* izoformų poveikį ir tyrimuose padidėjusi *FBXW7* raiška buvo susijusi su geresniu išgyvenamumu sergant tam tikromis vėžio formomis (Chen *et al.*, 2023). *VIM* raiškos reguliavimas pasireiškė priešingai nei, kad veikiant su siRNR-KRAS-A, šiuo atveju MCF-7 pastėta šio geno padidėjusi raiška, MDA-MB-231 sumažėjusi, kas vėlgi gali reikšti skirtingą *KRAS* izoformų veikimo mechanizmą. Nuslopinus *KRAS B* izoformą, šiuo atveju pasireiškė *CDHI* raiškos sumažėjimas abiejuose ląstelių gali rodyti atitinkamai padidėjusį invaziškumą ir galimus ląstelių likimo sprendimų pokyčius, kas rodytų, jog norint stabdyti MCF-7 ląstelių invaziškumą, reikėtų atkreipti į *KRAS-A* izoformos tildymą.

Poveikis anti-EGFR tikslingai sumažino *EGFR* raišką abiejose ląstelių linijose, greičiausiai paveikdamas ląstelių augimą ir išgyvenimo signalus, kuriuos perduoda *EGFR* kelias. Poveikis *KRAS* genams buvo įvairus: MCF-7 ląstelių linijoje šiek tiek padidėjo *KRAS-B*, o MDA-MB-231 padidėjo *KRAS-A* ir sumažėjo *KRAS-B* raiška. *FBXW7* raiška sumažėjo MCF-7, o raiškos

padidėjimas MDA-MB-231 ląstelių linijoje gali sukelti neigiamą grįžtamojo ryšio kilpą su *EGFR*, turinčią įtakos ląstelių augimui ir dalijimuisi. *VIM* sumažėjo abejose ląstelių linijose, kas galėjo lemti silpnesnę įtaką migracijai, nei slopinant su siRNR (3.3-3.4 pav.) *MAMLI* pakilo MCF-7, sumažėjo MDA-MB-231, kas galėtų reikšti sudėtingą signalinių sąsajų per NOTCH1 tinklą. *CDHI* pakilo abejose ląstelių linijose, parodant sumažėjusi invaziškumą.

Apibendrinus, dėl skirtingo poveikio genams, atsakingiems už EMT bei migracijos veiksnius po tildymo, ateities tyrimams būtų galima siūlyti kombinuotą šių sistemų slopinimo kombinaciją krūties navikinėms ląstelių linijoms.

#### 4.4 Genų sąveikos tinklo analizė

Ankstesni tyrimai patvirtina, kad *KRAS* ir *EGFR* yra labai sujungti mazgai genų sąveikos tinkle (Kennedy *et al.*, 2020). Be to, ankstesnis tyrimas nepabrėžė reikšmingo *FBXW7*, *VIM* ir *CDHI* vaidmens, nurodydamas galimą šių genų nepastebėtą svarbą baltymų ir baltymų sąveikoje.

Kita vertus, kitas tyrimas, su platesne genų analize atliktas parodė, kad *MAMLI* turi daugiau ryšių, o tai prieštarauja išvadoms, kad *MAMLI* yra žemesnės eilės mazgas (Patel *et al.*, 2023). Šis neatitikimas gali atsirasti dėl konkrečių ištirtų tinklų skirtumų *MAMLI* vaidmenis skirtinguose ląstelių procesuose.

Nepaisant šių skirtumų, pažymėtina, kad abu tyrimai pabrėžia genų tinklų sudėtingumą ir tarpusavio ryšį. Tai sustiprina išsamios tinklo analizės poreikį, kad būtų galima geriau suprasti genų sąveiką ir jų poveikį ląstelių funkcijai ir ligų procesams. Būsimiems tyrimams gali būti naudinga kryžminis skirtingų ląstelių tipų ar sąlygų sąveikos tinklų palyginimas, siekiant išsiaiškinti nuo konteksto priklausomus šių genų vaidmenis.

Taip pat labai svarbu pakartoti, kad mazgo jungčių skaičius arba „laipsnis“ nebūtinai yra tiesiogiai siejamas su jo biologine reikšme. Tyrimuose teigiama, kad nors aukšto laipsnio mazgai gali būti įtraukti į daugelį procesų dėl daugybės jungčių (P. Wang *et al.*, 2014). Todėl būtent žemesnio laipsnio mazgai dažnai atlieka specifinį ir svarbų vaidmenį tam tikruose keliuose.

## IŠVADOS

1. siRNR-KRAS-A nutildė KRAS-A transkripto raišką MCF-7 linijoje iki 58 % ir MDA-MB-231 linijoje iki 69 %; siRNR-KRAS-B nutildė KRAS-B transkripto raišką MCF-7 linijoje iki 12 % ir MDA-MB-231 linijoje iki 15 %.
2. Antikūnas prieš EGFR nuslopino *EGFR* raišką: MCF-7 ląstelių linijoje iki 2 %, MDA-MB-231 iki 1 %.
3. Visais atvejais ir laikais slopinant pasirinktų taikinių raišką, registruotas mažesnis migruojančių MCF-7 ląstelių plotas, lyginant su MDA-MB-231 ląstelėmis; ženkliausi skirtumai registruoti praėjus 48 val.: MCF-7 migruojančios ląstelės užėmė mažesnę plotą 17 %, veikiant siRNR-KRAS-A, 22 % veikiant siRNR-KRAS-B, 28 %, veikiant anti-EGFR, lyginant su MDA-MB-231 migruojančių ląstelių užimamu plotu.
4. anti-EGFR poveikis MCF-7 ląstelių linijoje reikšmingai sumažino *KRAS-A*, *KRAS-B*, *EGFR*, *MAML1*, *VIM*, padidino: *CDH1* geno raišką; MDA-MB-231 ląstelių linijoje reikšmingai sumažėjo *KRAS-B*, *EGFR*, *MAML1*, *VIM*, padidėjo: *FBXW7*, *CDH1* genų raiška.
5. siRNR-KRAS-A poveikis MCF-7 ląstelių linijoje reikšmingai sumažino *KRAS-A*, *EGFR*, *FBXW7*, padidino: *MAML1*, *VIM*, *CDH1* genų raišką; MDA-MB-231 ląstelių linijoje reikšmingai sumažėjo: *KRAS-A*, *FBXW7*, *CDH1* genų raiška.
6. siRNR-KRAS-B poveikis MCF-7 ląstelių linijoje reikšmingai sumažino: *KRAS-B*, *CDH1*, padidino: *VIM*, *FBXW7* genų raišką; MDA-MB-231 ląstelių linijoje reikšmingai sumažėjo *KRAS-A*, *KRAS-B*, *FBXW7*, *CDH1*, *VIM* genų raiška.
7. Mažiau piktybišku vėžiniu fenotipu pasižyminti MCF-7 ląstelių linija turėjo padidėjusią *FBXW7*, *CDH1* genų raišką, sumažėjusią genų *KRAS-B*, *VIM* raišką, lyginant su labiau piktybišku fenotipu pasižyminčia MDA-MB-231 ląstelių linija, ir po poveikio slopinančiais veiksniais (anti-EGFR, siRNR-KRAS-A, siRNR-KRAS-B) buvo stipriau inhibuojama MCF-7 ląstelių migracija bei pasireiškė skirtingas genų raiškos profilis.

## ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS

Savarankiškai atlikau literatūros analizę siekiant tikslingai suformuluoti tyrimo idėją, susidėlioti mokslinių metodų planą ir seką. Konsultuojantis su darbo vadovu, savarankiškai atlikau eksperimentus, susisteminau duomenis, aprašiau rezultatus ir pateikiau išvadas. Statistinė analizė buvo atlikta savarankiškai po konsultacijų su vadovu. Duomenų vizualizavimo metodus pasirinkau savarankiškai. Mokslinį darbą parašiau savarankiškai, sudėtingiausias tyrimu aspektus išdiskutuojant ir konsultuojantis su vadovu, mokslinės grupės nariais.

## **PADĖKA**

Nuoširdžiai dėkoju už darbo idėjos vystymą ir darbo metodų planavimą vadovei dr. Daivai Dabkevičienei ir darbo konsultantei j. m. d. Monikai Grubliauskaitei už pagalbą planuojant tyrimo eigą ir metodų pasiūlymus bei mokslines diskusijas, iškilus klausimams.

Dėkoju Nacionaliniam Vėžio Institutui, Biobankui, už suteiktas sąlygas atlikti baigiamąjį darbą, taip pat imunologijos laboratorijai už dovanotas navikines ląstelių kultūras bei molekulinės onkologijos laboratorijai už pagalbą ir leidimą naudotis laboratorine įranga.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Alam, M. S., Rahman, M. M., Hossain, M. A., Islam, M. K., Ahmed, K. M., Ahmed, K. T., Singh, B. C., & Miah, M. S. (2019). Automatic Human Brain Tumor Detection in MRI Image Using Template-Based K Means and Improved Fuzzy C Means Clustering Algorithm. In *Big Data and Cognitive Computing* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/bdcc3020027>
- Anurag, M., Zhu, M., Huang, C., Vasaikar, S., Wang, J., Hoog, J., Burugu, S., Gao, D., Suman, V., Zhang, X. H., Zhang, B., Nielsen, T., & Ellis, M. J. (2020). Immune Checkpoint Profiles in Luminal B Breast Cancer (Alliance). *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *112*(7), 737–746. <https://doi.org/10.1093/jnci/djz213>
- Baghani, L., Noroozi Heris, N., Khonsari, F., Dinarvand, S., Dinarvand, M., & Atyabi, F. (2022). Trimethyl-Chitosan Coated Gold Nanoparticles Enhance Delivery, Cellular Uptake and Gene Silencing Effect of EGFR-siRNA in Breast Cancer Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*, 871541. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.871541>
- Bianchini, G., De Angelis, C., Licata, L., & Gianni, L. (2022). Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options, evolving needs. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *19*(2), 91–113. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00565-2>
- Bismeyer, T., Van Der Velden, B. H. M., Canisius, S., Lips, E. H., Loo, C. E., Viergever, M. A., Wesseling, J., Gilhuijs, K. G. A., & Wessels, L. F. A. (2020). Radiogenomic analysis of breast cancer by linking MRI phenotypes with tumor gene expression. *Radiology*, *296*(2), 277–287.
- Bulun, S. E., Price, T. M., Aitken, J., Mahendroo, M. S., & Simpson, E. R. (1993). A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *77*(6), 1622–1628.
- Cai, W. Q., Zeng, L. S., Wang, L. F., Wang, Y. Y., Cheng, J. T., Zhang, Y., Han, Z. W., Zhou, Y., Huang, S. L., Wang, X. W., Peng, X. C., Xiang, Y., Ma, Z., Cui, S. Z., & Xin, H. W. (2020). The Latest Battles Between EGFR Monoclonal Antibodies and Resistant Tumor Cells. *Frontiers in Oncology*, *10*(July). <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01249>
- Castel, P., Rauen, K. A., & McCormick, F. (2020). The duality of human oncoproteins: drivers of cancer and congenital disorders. *Nature Reviews Cancer*, *20*(7), 383–397. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0256-z>
- Cejalvo, J. M., De Dueñas, E. M., Galván, P., García-Recio, S., Gasión, O. B., Paré, L., Antolín, S., Martinello, R., Blancas, I., Adamo, B., Guerrero-Zotano, Á., Muñoz, M., Nucíforo, P., Vidal, M., Pérez, R. M., López-Muniz, J. I. C., Caballero, R., Peg, V., Carrasco, E., ... Prat, A. (2017).

- Intrinsic subtypes and gene expression profiles in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Research*, 77(9), 2213–2221. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2717>
- Chaudhury, S., Rakhra, M., Memon, N., Sau, K., & Ayana, M. T. (2021). Breast Cancer Calcifications: Identification Using a Novel Segmentation Approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2021, 9905808. <https://doi.org/10.1155/2021/9905808>
- Chen, S., Lin, J., Zhao, J., Lin, Q., Liu, J., Wang, Q., Mui, R., & Ma, L. (2023). FBXW7 attenuates tumor drug resistance and enhances the efficacy of immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 13(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1147239>
- Connell, C. M., & Doherty, G. J. (2017). Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers. *ESMO Open*, 2(5), e000279.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279–3290.
- Dias, A. S., Almeida, C. R., Helguero, L. A., & Duarte, I. F. (2019). Metabolic crosstalk in the breast cancer microenvironment. *European Journal of Cancer*, 121, 154–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.09.002>
- Doody, J. F., Wang, Y., Patel, S. N., Joynes, C., Lee, S. P., Gerlak, J., Rolser, R. L., Li, Y., Steiner, P., & Bassi, R. (2007). Inhibitory activity of cetuximab on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(10), 2642–2651.
- Edwards, A., & Brennan, K. (2021). Notch Signalling in Breast Development and Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 692173. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.692173>
- Elmén, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Ørum, H., Koch, T., & Wahlestedt, C. (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Research*, 33(1), 439–447. <https://doi.org/10.1093/nar/gki193>
- Falcone, R., Lombardi, P., Filetti, M., Fabi, A., Altamura, V., Scambia, G., & Daniele, G. (2023). Molecular Profile and Matched Targeted Therapy for Advanced Breast Cancer Patients. *Current Oncology*, 30(2), 2501–2509.
- Fan, J., Bellon, M., Ju, M., Zhao, L., Wei, M., Fu, L., & Nicot, C. (2022). Clinical significance of FBXW7 loss of function in human cancers. *Molecular Cancer*, 21(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01548-2>
- Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research : BCR*, 10(2), R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>

- Fulford, L. G., Easton, D. F., Reis-Filho, J. S., Sofronis, A., Gillett, C. E., Lakhani, S. R., & Hanby, A. (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, *49*(1), 22–34.
- Goff, S. L., & Danforth, D. N. (2021). The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, *21*(1), e63–e73.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.06.011>
- Golay, H. G., & Barbie, D. A. (2014). Targeting cytokine networks in KRAS-driven tumorigenesis. In *Expert review of anticancer therapy* (Vol. 14, Issue 8, pp. 869–871). Taylor & Francis.
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Coates, A. S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology*, *22*(8), 1736–1747.
- Guo, Y. A. N. J. U. N., Pan, W. E. I. W. E. I., Liu, S. B., Shen, Z. F. E. I., Xu, Y., & Hu, L. L. (2020). *ERK / MAPK signalling pathway and tumorigenesis ( Review )*. 1997–2007.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X.-J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 101.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- Kanasty, R. L., Whitehead, K. A., Vegas, A. J., & Anderson, D. G. (2012). Action and Reaction : The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles. *Molecular Therapy*, *20*(3), 513–524.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2011.294>
- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *9*(7), 517–531.
- Kennedy, S. A., Jarboui, M.-A., Srihari, S., Raso, C., Bryan, K., Dernayka, L., Charitou, T., Bernal-Llinares, M., Herrera-Montavez, C., Krstic, A., Matallanas, D., Kotlyar, M., Jurisica, I., Curak, J., Wong, V., Stagljar, I., LeBihan, T., Imrie, L., Pillai, P., ... Kolch, W. (2020). Extensive rewiring of the EGFR network in colorectal cancer cells expressing transforming levels of KRAS(G13D). *Nature Communications*, *11*(1), 499. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14224-9>
- Khvorova, A., & Watts, J. K. (2017). The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility. *Nature Biotechnology*, *35*(3), 238–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.3765>
- Kim, E. S., Khuri, F. R., & Herbst, R. S. (2001). Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Current Opinion in Oncology*, *13*(6), 506–513. <https://doi.org/10.1097/00001622-200111000-00014>
- Kim, R.-K., Suh, Y., Yoo, K.-C., Cui, Y.-H., Kim, H., Kim, M.-J., Gyu Kim, I., & Lee, S.-J. (2015).



- Activation of KRAS promotes the mesenchymal features of basal-type breast cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 47(1), e137. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.99>
- Kroepil, F., Fluegen, G., Totikov, Z., Baldus, S. E., Vay, C., Schauer, M., Topp, S. A., Esch, J. S. am, Knoefel, W. T., & Stoecklein, N. H. (2012). Down-Regulation of CDH1 Is Associated with Expression of SNAI1 in Colorectal Adenomas. *PLOS ONE*, 7(9), e46665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046665>
- Lee, R. M., Vitolo, M. I., Losert, W., & Martin, S. S. (2021). Distinct roles of tumor associated mutations in collective cell migration. *Scientific Reports*, 11(1), 10291. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89130-6>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117–1134.
- Liao, W., Overman, M. J., Boutin, A. T., Shang, X., Zhao, D., Dey, P., Li, J., Wang, G., Lan, Z., & Li, J. (2019). KRAS-IRF2 axis drives immune suppression and immune therapy resistance in colorectal cancer. *Cancer Cell*, 35(4), 559–572.
- Lievre, A., Bachet, J.-B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouché, O., Landi, B., & Louvet, C. (2008). KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of Clinical Oncology*, 26(3), 374–379.
- Liu, M., Xi, L., Tan, T., Jin, L., Wang, Z., & He, N. (2021). A novel aptamer-based histochemistry assay for specific diagnosis of clinical breast cancer tissues. *Chinese Chemical Letters*, 32(5), 1726–1730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2020.11.072>
- Lu, R.-M., Hwang, Y.-C., Liu, I.-J., Lee, C.-C., Tsai, H.-Z., Li, H.-J., & Wu, H.-C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
- Luo, D., Xu, X., Iqbal, M. Z., Zhao, Q., Zhao, R., Farheen, J., Zhang, Q., Zhang, P., & Kong, X. (2021). siRNA-Loaded Hydroxyapatite Nanoparticles for KRAS Gene Silencing in Anti-Pancreatic Cancer Therapy. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091428>
- Ma, F., Ouyang, Q., Li, W., Jiang, Z., Tong, Z., Liu, Y., Li, H., Yu, S., Feng, J., Wang, S., Hu, X., Zou, J., Zhu, X., & Xu, B. (2019). Pyrotinib or Lapatinib Combined With Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer With Prior Taxanes, Anthracyclines, and/or Trastuzumab: A Randomized, Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(29), 2610–2619. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00108>
- Maennling, A. E., Tur, M. K., Niebert, M., Klockenbring, T., Zeppernick, F., Gattenlöhner, S., Meinhold-Heerlein, I., & Hussain, A. F. (2019). Molecular targeting therapy against EGFR family

- in breast cancer: progress and future potentials. *Cancers*, 11(12), 1826.
- Montemurro, F., Delalogue, S., Barrios, C. H., Wuerstlein, R., Anton, A., Brain, E., Hatschek, T., Kelly, C. M., Peña-Murillo, C., & Yilmaz, M. (2020). Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and brain metastases: exploratory final analysis of cohort 1 from KAMILLA, a single-arm phase IIIb clinical trial☆. *Annals of Oncology*, 31(10), 1350–1358.
- Murthy, R. K., Loi, S., Okines, A., Paplomata, E., Hamilton, E., Hurvitz, S. A., Lin, N. U., Borges, V., Abramson, V., Anders, C., Bedard, P. L., Oliveira, M., Jakobsen, E., Bachelot, T., Shachar, S. S., Müller, V., Braga, S., Duhoux, F. P., Greil, R., ... Winer, E. P. (2020). Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 382(7), 597–609. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1914609>
- Ngamcherdtrakul, W., & Yantasee, W. (2019). siRNA therapeutics for breast cancer: recent efforts in targeting metastasis, drug resistance, and immune evasion. *Translational Research : The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 214, 105–120. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.08.005>
- Nussinov, R., Wang, G., Tsai, C.-J., Jang, H., Lu, S., Banerjee, A., Zhang, J., & Gaponenko, V. (2017). Calmodulin and PI3K signaling in KRAS cancers. *Trends in Cancer*, 3(3), 214–224.
- Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12). <https://doi.org/10.3390/ijms23126806>
- Patel, D. K., Kesharwani, R., Verma, A., Al-Abbasi, F. A., Anwar, F., & Kumar, V. (2023). Scope of Wnt signaling in the precise diagnosis and treatment of breast cancer. *Drug Discovery Today*, 103597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103597>
- Plowman, S. J., Berry, R. L., Bader, S. A., Luo, F., Arends, M. J., Harrison, D. J., Hooper, M. L., & Patek, C. E. (2006). K-ras 4A and 4B are co-expressed widely in human tissues, and their ratio is altered in sporadic colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 25(2), 259–267.
- Poudel, P., Nyamundanda, G., Patil, Y., Cheang, M. C. U., & Sadanandam, A. (2019). Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. *Npj Breast Cancer*, 5(1), 21. <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0116-8>
- Prior, I. A., Hood, F. E., & Hartley, J. L. (2020). The Frequency of Ras Mutations in CancerRas Cancer Statistics. *Cancer Research*, 80(14), 2969–2974.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Robertson, S. C., Tynan, J. A., & Donoghue, D. J. (2000). RTK mutations and human syndromes: when

- good receptors turn bad. *Trends in Genetics*, 16(6), 265–271.
- Roncato, F., Rruga, F., Porcù, E., Casarin, E., Ronca, R., Maccarinelli, F., Realdon, N., Basso, G., Alon, R., Viola, G., & Morpurgo, M. (2018). Improvement and extension of anti-EGFR targeting in breast cancer therapy by integration with the Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies. *Nature Communications*, 9(1), 4070. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06602-6>
- Salemme, V., Centonze, G., Cavallo, F., Defilippi, P., & Conti, L. (2021). The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 11(March), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.610303>
- Sanchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Dimitriadoy, S., Liu, D. L., Kantheti, H. S., & Saghaforinia, S. (2018). Oncogenic signaling pathways in the cancer genome atlas. *Cell*, 173(2), 321–337.
- Santos, E., & Nebreda, A. R. (1989). Structural and functional properties of ras proteins. *The FASEB Journal*, 3(10), 2151–2163.
- Seok, H., Lee, H., Jang, E.-S., & Chi, S. W. (2018). Evaluation and control of miRNA-like off-target repression for RNA interference. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(5), 797–814. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2656-0>
- Sheth, D., & Giger, M. L. (2020). Artificial intelligence in the interpretation of breast cancer on MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 51(5), 1310–1324.
- Shinohara, F., Oashi, T., Harumoto, T., Nishikawa, T., Takayama, Y., Miyagi, H., Takahashi, Y., Nakajima, T., Sawada, T., Koda, Y., Makino, A., Sato, A., Hamaguchi, K., Suzuki, M., Yamamoto, J., Tomari, Y., & Saito, J.-I. (2021). siRNA potency enhancement via chemical modifications of nucleotide bases at the 5'-end of the siRNA guide strand. *RNA (New York, N.Y.)*, 27(2), 163–173. <https://doi.org/10.1261/rna.073783.119>
- Siddiqui, A. D., & Piperdi, B. (2010). KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Annals of Surgical Oncology*, 17, 1168–1176.
- Simanshu, D. K., & Morrison, D. K. (2022). A Structure Is Worth a Thousand Words: New Insights for RAS and RAF Regulation Structural Insights for RAS and RAF Regulation. *Cancer Discovery*, OF1–OF14.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., & Norton, L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine*, 344(11), 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>
- Soleimani, A., Mirzavi, F., Nikoofal-Sahlabadi, S., Nikpoor, A. R., Taghizadeh, B., Barati, M.,

- Soukhtanloo, M., & Jaafari, M. R. (2022). CD73 downregulation by EGFR-targeted liposomal CD73 siRNA potentiates antitumor effect of liposomal doxorubicin in 4T1 tumor-bearing mice. *Scientific Reports*, *12*(1), 10423. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14392-7>
- Sooro, M. A., Zhang, N., & Zhang, P. (2018). Targeting EGFR-mediated autophagy as a potential strategy for cancer therapy. *International Journal of Cancer*, *143*(9), 2116–2125.
- Sumimoto, H., Takano, A., Teramoto, K., & Daigo, Y. (2016). RAS-Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Is Required for Enhanced PD-L1 Expression in Human Lung Cancers. *PloS One*, *11*(11), e0166626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166626>
- Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., & Demeter, J. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci US A*, *100*(14), 8418–8423.
- Tokumaru, Y., Oshi, M., Katsuta, E., Yan, L., Satyananda, V., Matsuhashi, N., Futamura, M., Akao, Y., Yoshida, K., & Takabe, K. (2020). KRAS signaling enriched triple negative breast cancer is associated with favorable tumor immune microenvironment and better survival. *American Journal of Cancer Research*, *10*(3), 897.
- Trivedi, S., Jie, H.-B., & Ferris, R. L. (2014). Tumor antigen-specific monoclonal antibodies and induction of T-cell immunity. *Seminars in Oncology*, *41*(5), 678–684.
- Tsai, F. D., Lopes, M. S., Zhou, M., Court, H., Ponce, O., Fiordalisi, J. J., Gierut, J. J., Cox, A. D., Haigis, K. M., & Philips, M. R. (2015). K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(3), 779–784.
- Usman, S., Waseem, N. H., Nguyen, T. K. N., Mohsin, S., Jamal, A., Teh, M.-T., & Waseem, A. (2021). Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers*, *13*(19). <https://doi.org/10.3390/cancers13194985>
- Vantangoli, M. M., Madnick, S. J., Huse, S. M., Weston, P., & Boekelheide, K. (2015). MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. *PloS One*, *10*(8), e0135426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135426>
- Wang, L., Hu, H., Pan, Y., Wang, R., Li, Y., Shen, L., Yu, Y., Li, H., Cai, D., Sun, Y., & Chen, H. (2014). PIK3CA Mutations Frequently Coexist with EGFR/KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer and Suggest Poor Prognosis in EGFR/KRAS Wildtype Subgroup. *PLOS ONE*, *9*(2), e88291. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088291>
- Wang, P., Lü, J., & Yu, X. (2014). Identification of important nodes in directed biological networks: A network motif approach. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106132>

- Wawruszak, A., Halasa, M., Okon, E., Kukula-Koch, W., & Stepulak, A. (2021). Valproic acid and breast cancer: State of the art in 2021. *Cancers*, *13*(14), 1–23.  
<https://doi.org/10.3390/cancers13143409>
- Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, *8*(2), 129–138. <https://doi.org/10.1038/nrd2742>
- Yuan, M., Wang, Z., Lv, W., & Pan, H. (2022). The Role of Anti-EGFR Monoclonal Antibody in mCRC Maintenance Therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *9*(March), 1–12.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.870395>
- Zhang, Y., Liu, J. L., & Wang, J. (2020). KRAS gene silencing inhibits the activation of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway to regulate breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition, proliferation and apoptosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *24*(6), 3085–3096.

# PRIEDAI

## Priedas Nr. 1 Analizės kodas

```
import seaborn as sns
import matplotlib.pyplot as plt import pandas as pd
import numpy as np
import statsmodels.api as sm import networkx as nx

from statsmodels.formula.api import ols
from tabulate import tabulate
from statsmodels.stats.multicomp import pairwise_tukeyhsd from
statsmodels.formula.api import ols
from matplotlib import cm
from statsmodels.stats.multicomp import pairwise_tukeyhsd

# Data for treatments, time points, and migration percentages

treatments = ['siRNR-KRAS-A', 'siRNR-KRAS-B', 'siRNR-TK', 'siRNR-
scramble', 'ant

# Cytotoxicity percentages and standard deviations for sample

data_sample = np.array([[74.09476309, 100.621648],
[95.23690773, 88.10336421] std_devs = np.array([[27.30344039, 11.63581663],
[12.53547835, 1.512594248],

fig, axs = plt.subplots()
colors = ['#ff9b94', '#b84848', '#bae1ff', '#235f87', '#bae1ff']

# Plot the bar chart for sample 1 in the first subplot

axs.bar(np.arange(len(treatments))-0.2, data_sample[:, 1], yerr=std_devs[:,
axs.bar(np.arange(len(treatments))+0.2, data_sample[:, 0], yerr=std_devs[:,
axs.errorbar(np.arange(len(treatments))-0.2, data_sample[:, 1], yerr=std_dev
axs.errorbar(np.arange(len(treatments))+0.2, data_sample[:, 0], yerr=std_dev
axs.set_xticks(np.arange(len(treatments)))

axs.set_xticklabels(treatments, rotation =45) axs.set_ylabel('Neutraliai
raudono dažo įsisavinimas, %') axs.set_xlabel('Poveikis')
axs.legend(loc='center left', bbox_to_anchor=(1, 0.5))
```

```

# Adjust the spacing between subplots

plt.tight_layout()
fig.savefig('citotoksi.jpg', format='jpg', dpi=1000) # Display the plot
plt.show()

# Time points
time_points = [0, 24, 48] # Time points in hours

# Cell migration data for each sample at different time points

siRNR_Kras_A = [0, 42.7, 51.7] siRNR_Kras_B = [0, 37.7, 72.4]
siRNR_scramble = [0, 34.1, 55.8] Kontrolė = [0, 45.4, 100]

# Create a figure with a 2x1 grid for the picture grid

fig, axs = plt.subplots(2, 1, figsize=(8, 8))

# Plot the data in the first subplot

axs[1].plot(time_points, siRNR_Kras_A, marker='o', label='siRNR-Kras-A',
lin axs[1].plot(time_points, siRNR_Kras_B, marker='o', label='siRNR-Kras-B', lin
axs[1].plot(time_points, siRNR_scramble, marker='o', label='siRNR-scramble',
axs[1].plot(time_points, Kontrolė, marker='o', label='Kontrolė', linestyle='
axs[1].set_xlabel('Laikas, val')

axs[1].set_ylabel('Ląstelių migracija, %')
axs[1].set_title('B - MDA-MB-231 ląstelių migracijos pokytis per laiką', loc
axs[1].legend()

# Assuming you have another set of cell migration data for a different cell

MCF_siRNR_Kras_A = [0, 27.67015456, 34.2121804] MCF_siRNR_Kras_B = [0,
37.85145961, 38.25249103] MCF_siRNR_scramble = [0, 28.90025944, 42.43085306]
MCF_Kontrolė = [0, 31.95185377, 48.73207478]

# Plot the data in the second subplot

axs[0].plot(time_points, MCF_siRNR_Kras_A, marker='o', label='siRNR-Kras-
A', axs[0].plot(time_points, MCF_siRNR_Kras_B, marker='o', label='siRNR-Kras-B',
axs[0].plot(time_points, MCF_siRNR_scramble, marker='o', label='siRNR-scramb
axs[0].plot(time_points, MCF_Kontrolė, marker='o', label='Kontrolė', linesty
axs[0].set_xlabel('Laikas, val')

```

```

    axs[0].set_ylabel('Lastelių migracija, %')
axs[0].set_title('A - MCF-7 lastelių migracijos pokytis per laika', loc='lef
axs[0].legend()

    axs[1].set_xticks(time_points) axs[1].set_xticklabels(time_points)

    axs[0].set_xticks(time_points) axs[0].set_xticklabels(time_points)

    # Adjust the spacing between subplots

plt.tight_layout()

    # Display the plot

plt.show()
fig.savefig('trend.jpg', format='jpg', dpi=1000)

```

```

    # Data for treatments, time points, and migration percentages

    treatments = ['siRNR-KRAS-A', 'siRNR-KRAS-B', 'siRNR-scramble', 'Kontrolè']
time_points = ['24 valandos', '48 valandos']

    # Migration percentages and standard deviations for sample 1

    migration_data_sample1 = np.array([[42.7, 51.7], [37.7, 72.4], [34.1, 55.8],
[ std_devs_sample1 = np.array([[3, 5], [4, 6], [2, 4], [5, 7]])

    # Migration percentages and standard deviations for sample 2

    migration_data_sample2 = np.array([[30, 35], [40, 50], [55, 65], [65, 75]])
std_devs_sample2 = np.array([[2, 4], [3, 5], [4, 6], [6, 8]])

    # Create a figure with a 2x1 grid for the picture grid

fig, axs = plt.subplots(2, 1, figsize=(8, 8))
colors = ['#ff9b94', '#b84848', '#bae1ff', '#235f87', '#bae1ff']

    # Plot the bar chart for sample 1 in the first subplot

    axs[1].bar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample1[:, 0],
yer axs[1].bar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample1[:, 1], yer
axs[1].errorbar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample1[:, 0]

```



```

axs[1].errorbar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample1[:, 1]
axs[1].set_xticks(np.arange(len(treatments))) axs[1].set_xticklabels(treatments)

    axs[1].set_ylabel('Ląstelių migracija, %') axs[1].set_xlabel('Poveikis')
axs[1].set_title('B - MDA-MB-231', loc='left') axs[1].legend()

    # Plot the bar chart for sample 2 in the second subplot

    axs[0].bar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample2[:, 0],
yer axs[0].bar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample2[:, 1], yer
axs[0].errorbar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample2[:, 0]
axs[0].errorbar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample2[:, 1]
axs[0].set_xticks(np.arange(len(treatments))) axs[0].set_xticklabels(treatments)

    axs[0].set_ylabel('Ląstelių migracija, %') axs[0].set_xlabel('Poveikis')
axs[0].set_title('A - MCF-7', loc='left') axs[0].legend()

    # Adjust the spacing between subplots

plt.tight_layout() plt.set_cmap('Pastell1')

dpi=300
# Display the plot plt.show()

fig.savefig('mirga.jpg', format='jpg', dpi=1000)

```

```

# Data for treatments, time points, and migration percentages

treatments = ['anti-EGFR', 'Kontrolė'] time_points = ['24 valandos', '48
valandos']

# Migration percentages and standard deviations for sample 1

migration_data_sample1 = np.array([[31.9, 68.0], [45.4, 100.0]])
std_devs_sample1 = np.array([[7, 10], [5, 7]])

# Migration percentages and standard deviations for sample 2

migration_data_sample2 = np.array([[25, 40], [65, 75]]) std_devs_sample2 =
np.array([[2, 4], [6, 8]])

# Create a figure with a 2x1 grid for the picture grid

```

```

fig, axs = plt.subplots(2, 1, figsize=(8, 8))
colors = ['#ff9b94', '#b84848', '#bae1ff', '#235f87', '#bae1ff']

# Plot the bar chart for sample 1 in the first subplot

axs[1].bar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample1[:, 0],
yer axs[1].bar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample1[:, 1], yer
axs[1].errorbar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample1[:, 0]
axs[1].errorbar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample1[:, 1]
axs[1].set_xticks(np.arange(len(treatments))) axs[1].set_xticklabels(treatments)

axs[1].set_ylabel('Ląstelių migracija, %') axs[1].set_xlabel('Poveikis')
axs[1].set_title('B - MDA-MB-231', loc='left') axs[1].legend()

# Plot the bar chart for sample 2 in the second subplot

axs[0].bar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample2[:, 0],
yer axs[0].bar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample2[:, 1], yer
axs[0].errorbar(np.arange(len(treatments))-0.2, migration_data_sample2[:, 0]
axs[0].errorbar(np.arange(len(treatments))+0.2, migration_data_sample2[:, 1]
axs[0].set_xticks(np.arange(len(treatments))) axs[0].set_xticklabels(treatments)

axs[0].set_ylabel('Ląstelių migracija, %') axs[0].set_xlabel('Poveikis')
axs[0].set_title('A - MCF-7', loc='left') axs[0].legend()

# Adjust the spacing between subplots

plt.tight_layout() plt.set_cmap('Pastel1')

dpi=300
# Display the plot plt.show()

fig.savefig('mirga_E.jpg', format='jpg', dpi=1000)

```

```

# Create a DataFrame with the provided data

data = pd.read_csv('migracija.csv')
# Define model formula for Two-Way ANOVA (with interaction term)

formula = 'Migration ~ C(CellLine) + C(Treatment) + C(Time) +
C(CellLine):C(

```

```

# Perform Two-Way ANOVA

model = ols(formula, data).fit()
aov_table = sm.stats.anova_lm(model, typ=2)

print(aov_table)

# Now let's perform ANOVA and Tukey's HSD for each gene

for gene in data['Gene'].unique(): df_genel = data[data['Gene'] == gene]

# Model excluding interaction term

model = ols('Expression ~ C(Treatment)', df_genel).fit() anova_table =
sm.stats.anova_lm(model, typ=2)

print(f"ANOVA results for {gene}:\n")
print(anova_table, "\n")

# Only perform the Tukey's HSD test if the ANOVA is significant

if anova_table.loc['C(Treatment)', 'PR(>F)'] < 0.05:
print(f"Performing Tukey's HSD for {gene} as ANOVA is significant... tukey =
pairwise_tukeyhsd(endog=df_genel['Expression'], groups=df_ge
print(tukey.summary(), "\n")

```

```

# Gene names

genes = ['KRAS-A', 'KRAS-B', 'EGFR', 'FBXW7', 'VIM', 'MAML1', 'CDH1']

# Gene expression values for each gene (2 biological replicas)

expression_data_MC_A = [[-1.12475482, 0.0], [1.760320524, -1.840187294], [-
2 expression_data_MC_B = [[1.367470482, 2.367470482], [-2.874062851, -3.2277289
expression_data_MD_A = [[-0.853319358, 0.001], [4.265887839, 1.19021081], [-
expression_data_MD_B = [[-0.772471165, -4.75258385], [-0.772471165, -4.75258
expression_data_MC_E = [[0.01, 0.001], [2.148653371, 3.148653371], [-7.37304
expression_data_MD_E = [[1.633449047, 0.001], [-3.550405095, 1.19021081], [-
expression_data_K = [[-1.076800969, -1.076800969], [-5.192578195, -5.19257819

# Standard deviation for each gene

sd_data_MC_A = [[0.117459952, 0.05], [0.073296826, 0.073296826], [0.3,
0.5], sd_data_MC_B = [[0.1, 0.05], [0.6, 0.2], [0.2, 0.3], [0.5, 0.1], [0.15,

```

```

0.3] sd_data_MD_A = [[0.1, 0.05], [0.9, 0.3], [0.67, 0.13], [0.3, 0.3], [0.3,
0.] sd_data_MD_B = [[0.1, 0.05], [0.2, 0.1], [0.3, 0.15], [0.1, 0.1], [0.15, 0.0
sd_data_MC_E = [[0.1, 0.05], [0.2, 0.1], [0.3, 0.15], [0.1, 0.5], [0.15, 0.9
sd_data_MD_E = [[0.1, 0.05], [0.2, 0.1], [0.3, 0.15], [0.1, 0.1], [0.3, 0.08
sd_data_K = [[0.1, 0.05], [0.2, 0.1], [0.3, 0.15], [0.1, 0.1], [0.15, 0.08],

    # Gene expression values for each sample (2 biological replicas)

    expression_data = [ expression_data_MC_A, expression_data_MC_B,
expression_data_MD_A, expression_data_MD_B, expression_data_MC_E,
expression_data_MD_E, expression_data_K

    ]

    # Standard deviation for each sample

sd_data = [ sd_data_MC_A,

            sd_data_MC_B,
            sd_data_MD_A,
            sd_data_MC_B,
            sd_data_MC_E,
            sd_data_MD_E,

sd_data_K

    # Fold change threshold

fold_change_threshold = 1

    # Calculate the number of rows and columns for the subplots

num_samples = len(samples)
num_rows = (num_samples + 1) // 4 # Add 1 to ensure the last empty subplot
num_cols = 4

    # Create a figure and subplots

fig, axs = plt.subplots(num_rows, num_cols, figsize=(10, 6))

    # Iterate over the sample data and subplots

```

```

    for i, sample_data in enumerate(expression_data): row = i // num_cols
col = i % num_cols

    # Extract the sample name and expression data

    sample_name = samples[i]
expression_replica1 = [data[0] for data in sample_data] expression_replica2 =
[data[1] for data in sample_data]

    # Plot replica 1 as black

    axs[row, col].errorbar(range(len(expression_replica1)), expression_repli #
Plot replica 2 as blue

    axs[row, col].errorbar(range(len(expression_replica2)), expression_repli

    # Add horizontal lines at the fold change thresholds

    axs[row, col].axhline(y=-fold_change_threshold, color='red', linestyle='
axs[row, col].axhline(y=fold_change_threshold, color='green', linestyle=

    # Set subplot title

    axs[row, col].set_title(sample_name)

    # Set x-axis tick labels

    axs[row, col].set_xticks(range(len(genes))) axs[row,
col].set_xticklabels(genes, rotation=45)

    # Add standard deviation ticks

    for x, sd in enumerate(sd_data[i]):
axs[row, col].plot([x, x], [expression_data[i][x][0] - sd[0], expres axs[row,
col].plot([x, x], [expression_data[i][x][1] - sd[1], expres

    # Remove the last empty subplot if necessary

    if num_samples % 2 == 1: fig.delaxes(axs[-1, -1])

    # Set plot labels and title
#fig.suptitle('Gene Expression Scatter Plot')

```

```

fig.text(0.5, -0.04, 'Genai', ha='center')
fig.text(-0.04, 0.5, 'Santykinis genu raiškos lygis, (log2)', va='center', r

    # Adjust spacing between subplots

fig.tight_layout(rect=[0, 0, 1, 0.96])

    # Show the plot

plt.show()
dpi=300
fig.savefig('gene_expression.jpg', format='jpg')

]

    # Assuming the data is stored in a CSV file named "data.csv"

data_exp = pd.read_csv('genes_g.csv')
data_no_control = data_exp[data_exp['Treatment'] != 'control']

    # Pivot the dataframe to get it in the right format for a heatmap

pivot = data_no_control.pivot_table(index='Gene', columns=['CellLine',
'Trea # Transpose the pivot table

pivot_transposed = pivot.T

    # Create the heatmap
plt.figure(figsize=(10, 8)) # Adjust as needed
sns.heatmap(pivot_transposed, cmap='RdBu_r', annot=True, fmt=".2f", center=0

    # Set plot labels and title

plt.xlabel('Genai')
plt.ylabel('Lastelių linija ir poveikis') #plt.title('Gene Expression Heatmap')
dpi=1000
    # Display the plot
plt.show()

    # Generate the clustermap

g = sns.clustermap(pivot_transposed, cmap='coolwarm', annot=True,
fmt=".2f",

```

```

    # Set plot labels and title
g.ax_heatmap.set_xlabel('Genai') # Use `set_xlabel` to set the x label
g.ax_heatmap.set_ylabel('Lastelių linija ir poveikis') # Use `set_ylabel`
dpi=1000

    # Display the plot

plt.show()

    gene_list_input = ["KRAS", "EGFR", "FBXW7", "Vimentin", "MAML1", "CDH1"]
# Construct the URL for the STRING API using gene identifiers and specify th
genes = '%0d'.join(gene_list_input)
url = 'https://string-db.org/api/tsv/network?identifiers=' + genes + '&speci

    # Construct the URL for the STRING API using gene identifiers and specify
th

    genes = '%0d'.join(gene_list_input)
url = 'https://string-db.org/api/tsv/network?identifiers=' + genes + '&speci

    # Fetch the network data from the API

    r = requests.get(url)
lines = r.text.split('\n')
data = [l.split('\t') for l in lines]
df = pd.DataFrame(data[1:-1], columns=data[0])

    # Extract the interactions from the data

interactions = df[['preferredName_A', 'preferredName_B', 'score']]
interactions = np.array(interactions)

    # Create a new graph

G = nx.Graph(name='Gene Interaction Graph')

    # Add weighted edges to the graph

    for i in range(len(interactions)): interaction = interactions[i]
a = interaction[0] # gene A node

```

```

    b = interaction[1] # gene B node
w = float(interaction[2]) # score as weighted edge where high scores =
G.add_weighted_edges_from([(a, b, w)])

    # Position the nodes using the spring layout and scale the distance

pos = nx.spring_layout(G, k=1/np.sqrt(G.order()*15, seed=42)

    # function to rescale list of values to range [newmin,newmax]

def rescale(l,newmin,newmax): arr = list(l)

    return [(x-min(arr))/(max(arr)-min(arr))*(newmax-newmin)+newmin for x in #
use the matplotlib plasma colormap
graph_colormap = cm.get_cmap('plasma', 12)
# node color varies with Degree

    c = rescale([G.degree(v) for v in G],0.0,0.9)
c = [graph_colormap(i) for i in c]
# node size varies with betweenness centrality - map to range [10,100]
bc = nx.betweenness centrality(G) # betweenness centrality
s = rescale([v for v in bc.values()],1500,7000)
# edge width shows 1-weight to convert cost back to strength of interaction ew =
rescale([float(G[u][v]['weight']) for u,v in G.edges],0.1,4)
# edge color also shows weight
ec = rescale([float(G[u][v]['weight']) for u,v in G.edges],0.1,1)
ec = [graph_colormap(i) for i in ec]

    # Define the node color based on degree and the node size based on
betweenne

    graph_colormap = cm.get_cmap('plasma', 12)
c = rescale([G.degree(v) for v in G], 0.0, 0.9) c = [graph_colormap(i) for i in
c]
bc = nx.betweenness centrality(G)
s = rescale([v for v in bc.values()], 1500, 7000)

    # Define the edge width and color based on the strength of the interaction

ew = rescale([float(G[u][v]['weight']) for u, v in G.edges], 0.1, 4) ec =
rescale([float(G[u][v]['weight']) for u, v in G.edges], 0.1, 1) ec =
[graph_colormap(i) for i in ec]

```



```
# Plot the graph

plt.figure(figsize=(19, 9), facecolor=[0.7, 0.7, 0.7, 0.4])
nx.draw_networkx(G, pos=pos, with_labels=True, node_color=c, node_size=s, ed

plt.axis('off') plt.show()

font_color='white', font_weight='bold', font_size='9')
```

**Priedas nr. 2** MCF-7 ir MDA-MB-231 navikinių ląstelių išskirtos RNR kiekybinis ir kokybinis įvertinimas

Ląstelių linija ir poveikis	Išskirtos RNR koncentracija (ng/ $\mu$ L)	A <sub>260/280</sub>
MCF-7 siRNR-Kras-A	28.7	1,9
MCF-7 siRNR-Kras-B	194.6	2,09
MCF-7 siRNR-TK	132.4	2,03
MCF-7 siRNR-scramble	204.9	1,97
MCF-7 anti-EGFR	185	1,98
MCF-7 kontrolė	102.2	2,11
MDA-MB-231 siRNR-Kras-A	32.9	2,08
MDA-MB-231 siRNR-Kras-A	62.6	2,08
MDA-MB-231 siRNR-TK	28.5	2,09
MDA-MB-231 siRNR-scramble	36.7	2,08
MDA-MB-231 anti-EGFR	33.7	2,07
MDA-MB-231 kontrolė	35.4	1,98