

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.593>

<https://orcid.org/0000-0001-7228-1292>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Vilmantė Žitkutė

Atsparumo 5-fluoruracilui ir
oksaliplatinai molekulinų mechanizmų
tyrimai žmogaus kolorektalinės
karcinomos ląstelėse

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai
biochemija (N 004)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2017–2021 metais Vilniaus universitete Gyvybės mokslų centre Biomokslų institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (SEN-17/2015 ir P-DAP-19-126), Vilniaus universiteto mokslo skatinimo fondas (MSF-JM-2/2021).

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinė konsultantė – doc. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Gynimo taryba:

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

Nariai:

Dr. Veronika Viktorija Borutinskaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004),

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

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

Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. balandžio mėn. 24 d. 14 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva.

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

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.593>

<https://orcid.org/0000-0001-7228-1292>

VILNIUS UNIVERSITY

Vilmantė Žitkutė

The analysis of the molecular
mechanisms of resistance to
5-fluorouracil and oxaliplatin in
human colorectal carcinoma cells

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences

Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2017 and 2021 at Vilnius University.

The research was supported by Research Council of Lithuania (SEN-17/2015 and P-DAP-19-126) and the Research Promotion Fund of Vilnius University (MSF-JM-2/2021).

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant – Assoc. prof. dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004).

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

Chairman – Prof. dr. Daiva Baltriukienė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004).

Members:

Dr. Veronika Viktorija Borutinskaitė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004),

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

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (National cancer institute, natural sciences, biochemistry, N 004),

Dr. Giedrius Vilkaitis (Vilnius University, natural sciences, biochemistry, N 004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 2 p.m. on 24th April 2024 in auditorium R401 of the Life Science Centre of Vilnius University. Address: Saulėtekis Ave. 7, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	8
MOKSLINIS NAUJUMAS	11
GINAMIEJI TEIGINIAI	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Kolorektalinio vėžio problematika.....	14
1.2. 5-FU ir OxaPt veikimo mechanizmai	16
1.3. Atsparumo 5-FU ir OxaPt mechanizmai CRC atveju	20
1.4. Citokinai	23
1.5. Serpinai	26
1.6. Autofagija.....	30
1.7. Selektivi autofagija ir p62 funkcijos	35
1.8. Apoptozė ir nekroptozė	40
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	43
2.1. Medžiagos ir tirpalai	43
2.2. Ląstelių linijos ir kultivavimas.....	44
2.3. Eksperimentų atlikimo eiga.....	45
2.4. Transfekcijos siRNR eksperimentų eiga	46
2.5. Ląstelių transfekcija siRNR	47
2.6. Kiekybinė PGR	48
2.7. Imunoblotingas.....	49
2.8. Tėkmės citometrija.....	52
2.9. Imunofermentinis metodas „ELISA“	52
2.10. Ląstelių frakcijų atskyrimas	52
2.11. Ląstelių gyvybingumo nustatymas.....	52
2.12. Baltymų tarpusavio sąveikų tinklo sudarymas	53
2.13. Statistinė analizė	54
3. REZULTATAI	55

3.1. Ląstelių atsparumas 5-FU ir OxaPt.....	55
3.2. Citokinų raiška HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose.....	57
3.3. Serpinų raiška HCT116 ir SW620 linijose bei jų sublinijose	60
3.4. Autofagijos reikšmė atsparumui	64
3.5. p62 reikšmė atsparumui	70
4. DISKUSIJA	80
IŠVADOS.....	90
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION.....	91
PRIEDAI	156
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	165
PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	166
STAŽUOTĖS	167
PEDAGOGINĖ VEIKLA	167
DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE.....	167
CURRICULUM VITAE	168
PADĖKA.....	169

SANTRUMPOS

5-FU	5-fluoruracilas
CIMP	CpG salų metilinimo fenotipas
CIN	Chromosomų nestabilumas
CRC	Kolorektalinis vėžys
CQ	Chlorokvinas
CMS	Sutartinis molekulinis potipis
CTT	Citotoksiškumas, žuvusių ląstelių kiekis procentais
ECM	Tarpląstelinis užpildas
ET	Endoplazminis tinklas
FC	Tėkmės citometrija
HC	Ląstelių skaičiavimas hemacitometru
IC ₅₀	Vaisto koncentracija, nužudanti 50 % ląstelių
IQR	Tarpkvartilinis plotis, žymi 25-tą ir 75-tą procentilius
kPGR	Kiekybinė PGR
KV	Ląstelių gyvybingumo vertinimas kristaliniu violetiniu
LC3B-I	Citoplazminė LC3B forma
LC3B-II	Prie autofagosomų membranų prijungta lipidinė LC3B forma
MDR	Daugybiniis atsparumas vaistams
MSI/MSS	Mikrosatelitų nestabilumas/stabilumas
MTT	Ląstelių gyvybingumo vertinimas naudojant MTT reagentą
NK	Neigiama kontrolė, žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys
OxaPt	Oksaliplatina
PE	Fosfatidiletanolaminas
RI	Atsparumo indeksas, nurodantis santykį tarp vaistams atsparių ir jautrių ląstelių IC ₅₀ .
ROS	Aktyvios deguonies formos
SB1/B5/E1/E2	Serpina B1/B5/E1/E2
<i>SERPIN5</i>	Serpino B5 baltymą koduojantis genas/transkriptas
SDS	Natrio dodecilsulfatas
siRNR	Maža interferuojanti RNR
<i>SQSTM1</i>	p62 baltymą koduojantis genas/transkriptas
WB	Imunoblotingas (angl. <i>western blot</i>)

ĮVADAS

Pasaulio sveikatos organizacijos naujausiais duomenimis kolorektalinis vėžys (CRC) yra vienas iš dažniausiai pasitaikančių vėžinių susirgimų pasaulyje. Jis užima trečią vietą pagal paplitimą ir antrą pagal mirčių nuo vėžio skaičių (Sung *et al.*, 2021). Viena iš priežasčių, lemiančių tokią didelį mirtingumą – vėlyva diagnozė, kai CRC yra pažengusios stadijos, o gydymo galimybės yra ribotos. Pažengusio CRC gydymui dažniausiai yra taikoma chemoterapija naudojant pavienį 5-fluoruracilo (5-FU) poveikį arba jo kombinaciją su oksaliplatina (OxaPt) ir leukovorinu (foline rūgštimi) (Hossain *et al.*, 2022). Kita priežastis, lemianti CRC sergančių pacientų aukštą mirtingumo lygį – atsparumas chemoterapiniams vaistams. Vėžinės ląstelės gali pasisžymėti atsparumu dar prieš gydymą (įgimtas atsparumas) arba atsparumas gali išsivystyti gydymo metu (įgytas atsparumas). CRC gydymui naudojami 5-FU ir OxaPt veikia skirtingais mechanizmais (Very *et al.*, 2018), todėl ir atsparumo mechanizmai šiems vaistams skiriasi (Marin *et al.*, 2020). Pagrindiniai atsparumo mechanizmai – viduląstelinės vaisto koncentracijos mažinimas, DNR pažaidų reparacijos ir išgyvenimo signalinių kelių aktyvinimas, programuotos ląstelių žūties slopinimas, vaisto neutralizavimas ar taikinio pokyčiai (Liu *et al.*, 2021). Atsparumo chemoterapiniams vaistams molekulinį mechanizmų supratimas tebėra svarbi mokslinių tyrimų sritis, siekiant nustatyti tikslus taikinius ir atrasti vaistus, pagerinančius vėžio gydymo rezultatus.

Uždegiminiai procesai atlieka svarbų vaidmenį vystantis CRC, be to, gali būti svarbūs ir atsparumo išsivystymui. Vienas iš naujausių atsparumo chemoterapiniams vaistams mechanizmų – naviko ląstelių sekretomo pokyčiai (TCS, angl. *tumour cell secretome*), t. y. vėžinių ląstelių išskiriamų molekulių visuma, skatinanti vėžio vystymąsi. Chemoterapiniai vaistai gali keisti TCS ir taip skatinti atsparumą (Madden *et al.*, 2020). Citokinai įeina į TCS sudėtį, tačiau žinių, apie jų įtaką chemoterapinių vaistų sukeltam atsparumui, nėra daug. Citokinai – tai mažos signalinės molekulės, reguliuojančios uždegimą ir homeostazę bei parakriniškai ir autokriniškai reguliuojančios vėžinių ląstelių išgyvenimą, proliferaciją, migraciją, angiogenezę ir kitus procesus, svarbius vėžio progresijai (Borowczak *et al.*, 2022, Propper, Balkwill, 2022).

Pastaruoju metu serpinai tapo daugelio mokslininkų dėmesio centru, nes nemažai šios šeimos baltymų dalyvauja daugelyje naviko formavimosi etapų: nuo angiogenezės iki naviko augimo ir progresijos (Sanrattana *et al.*, 2019). Serpinai – tai serino proteazių inhibitoriai, reguliuojantys angiogenezę, uždegimą, tarpląstelinio užpildo persitvarkymą, programuotą ląstelių žūtį ir

ląstelių vystymąsi, o jų raiškos pokyčiai siejami su naviko progresija (Mkaouar *et al.*, 2019). Serpinų įtaka CRC progresijai yra nevienareikšmiška, nes kai kurie serpinai gali slopinti, o kiti priešingai – aktyvinti vystymąsi ar metastazavimą (Paczek, Mroczko, 2022). Nors žinių, apie serpinų įtaką vėžio vystymuisi daugėja, tačiau apie jų kiekio pokyčius vaistams atspariose ląstelėse ar įtaką atsparumui iki šiol yra žinoma mažai.

Autofagija vėžinėse ląstelėse gali atlikti dvigubą vaidmenį – slopinti jų vystymąsi arba priešingai – padėti išvengti nepalankių sąlygų (Lim *et al.*, 2021). Ankstyvose vėžio vystymosi stadijose, kol ląstelė nėra tapusi vėžine, autofagija slopina vėžio vystymąsi, o ląstelėms supiktybėjus, autofagija apsaugo nuo nepalankių augimo sąlygų, tokių kaip maisto, deguonies, energijos trūkumo, ar padidėjusio aktyvių deguonies formų kiekio (Chavez-Dominguez *et al.*, 2020). Žinoma, kad CRC ląstelės, lyginant su sveikomis, pasižymi padidėjusiu autofagijos intensyvumu (H. Wang *et al.*, 2021). Šiuo metu atliekami fundamentiniai tyrimai ir klinikiniai bandymai rodo, kad farmakologinis ar molekulinis autofagijos blokavimas gali būti panaudotas siekiant pagerinti priešvėžinį chemoterapinių vaistų veiksmingumą (Zamame Ramirez *et al.*, 2021), tačiau trūksta žinių apie jos įtaką chemoterapinių vaistų indukuotam atsparumui.

CRC audiniuose, lyginant su sveiku audiniu, yra nustatomas padidėjęs selektyvios autofagijos receptoriaus p62 kiekis, be to šis baltymas yra siejamas su vėžinių ląstelių agresyvumu (Tang *et al.*, 2021) bei bloga sergančių pacientų gijimo prognoze (J. Zhang *et al.*, 2019). p62 dėl savo daugiadomenės struktūros gali reguliuoti įvairius procesus: ląstelių žūtį, išgyvenimą, uždegimą, oksidacinį stresą bei naviko vystymąsi (Hennig *et al.*, 2021, Kumar *et al.*, 2022). Nors daugėja duomenų apie p62 kiekio pokyčius chemoterapiniams vaistams atspariose vėžinėse ląstelėse ir reikšmę atsparumui, tačiau tikslus atsparumą lemiantis mechanizmas vis dar nėra aiškus.

Šio **darbo tikslas** – įvertinti citokinų, serpinų, autofagijos baltymų kiekio pokyčius chemoterapiniams vaistams atspariose kolorektalinės karcinomos ląstelėse ir nustatyti autofagijos reikšmę atsparumui.

Uždaviniai:

- Palyginti citokinų, serpinų ir autofagijos baltymų kiekio bei autofagijos intensyvumo pokyčius chemoterapiniams vaistams jautriose ir atspariose kolorektalinio vėžio ląstelėse;
- Įvertinti citokinų, serpinų ir autofagijos baltymų kiekio bei autofagijos intensyvumo pokyčius po 5-FU ir OxaPt poveikio chemoterapiniams vaistams jautriose ir atspariose kolorektalinio vėžio ląstelėse;
- Nustatyti autofagijos baltymų reikšmę HCT116 ląstelių ir jų chemoterapiniams vaistams atsparių sublinijų atsparumui.

MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiame darbe palyginome citokinų transkriptų raišką CRC ląstelių sublinijose, kurios pasižymi skirtingu atsparumu chemoterapiniams vaistams. Nustatėme, kad HCT116/FU ląstelėse, lyginant su jautriomis, yra pakitusi apie pusės tirtų citokinų ir jų receptorių transkriptų raiška (14 iš 27). Tuo tarpu HCT116/OXA ląstelėse nustatėme tik ketvirtadalio tirtų citokinų transkriptų pokytį lyginant su tėvine linija. Žinių, apie citokinų įtaką chemoterapinių vaistų sukeltam atsparumui CRC ląstelėse, nėra daug. Parodyta, kad interleukinas 1 β (IL1 β) padidina CRC ląstelių, tame tarpe ir HCT116, atsparumą 5-FU poveikiui (Spagnardi *et al.*, 2022). Kiti autoriai parodė, kad doksorubicinui atspariose HCT116 ląstelėse yra padidėjęs IL8 ir IL10 kiekis, o IL8 tildymas padaro ląsteles jautresnes vaisto poveikiui (Du *et al.*, 2018). Be to, yra nustatyta, kad IL17 lemia HCT116 ląstelių atsparumą cisplatinai (Sui *et al.*, 2019). Šiame darbe taip pat nustatėme citokinų raiškos pokyčius HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose po 5-FU ir OxaPt poveikio. Įdomu tai, kad jautriose ląstelėse 5-FU ir OxaPt reikšmingai didina citokinų raišką, HCT116/FU ląstelėse – tik OxaPt, o HCT116/OXA ląstelėse priešingai – tik 5-FU poveikis.

Pirmieji parodėme serino proteazių inhibitorių (serpinų) kiekio pokyčius chemoterapiniams vaistams atspariose CRC ląstelėse. Nustatėme, kad HCT116/FU, HCT116/OXA ir SW620/OXA ląstelėse serpino B5 (SB5) kiekis yra padidėjęs lyginant su jautriomis ląstelėmis, o SW620/FU ląstelėse priešingai – sumažėjęs. Taip pat nustatėme, kad 5-FU ir OxaPt poveikis didina citoplazmoje esančio SB5 kiekį HCT116, HCT116/FU, SW620 ir SW620/FU ląstelėse. HCT116/OXA ląstelėse SB5 kiekis didėja po 5-FU, o SW620/OXA ląstelėse – po OxaPt poveikio. SW620 ląstelėse ir jų sublinijose, kuriose didelė dalis SB5 yra lokalizuota branduolyje, jame esančio SB5 kiekis priklauso nuo ląstelių linijos, vaisto ir jo dozės. 5-FU ir OxaPt taip pat didina ir kitų serpinų transkriptų raišką – *SBI*, *SE1*, *SE2*, o jų pokyčiai priklauso nuo ląstelių linijos ir poveikio. Kitų mokslininkų tyrimuose parodyta, kad cisplatinai atspariose kiaušidžių vėžio ląstelėse yra padidėjęs SE1 ir SE2 baltymų kiekis (Pan *et al.*, 2017), o paklitakseliui atspariose krūties vėžio ląstelėse – SB3 ir SB4 (Pavlikova *et al.*, 2014).

Nors ir daugėja duomenų, įrodančių autofagijos reikšmę įgytam chemoterapinių vaistų atsparumui įvairiuose vėžio atvejuose, tame tarpe ir CRC, tačiau molekuliniai veikimo mechanizmai yra mažai ištirti. Šiame darbe pirmieji nustatėme, kad HCT116/FU ląstelėse, lyginant su HCT116, ATG12 baltymo kiekis yra padidėjęs. Taip pat parodėme, kad *ATG12* raiškos tildymas sumažina HCT116 ląstelių ir jų atsparių sublinijų gyvybingumą, bei padidina

HCT116 ir HCT116/FU ląstelių jautrumą OxaPt poveikiui. Šiuo metu yra žinomi tik keli atvejai, kai autofagijos slopinimas didina atsparių CRC ląstelių jautrumą vaistams. Parodyta, kad 5-FU atsparios DLD1 ląstelės po autofagijos slopinimo 3-metiladeninu ar *ATG7* raiškos tildymo tapo jautresnės vaisto poveikiui (Li *et al.*, 2010). Taip pat 5-FU atsparios HCT8 ląstelės tapo jautresnės poveikiui po autofagijos slopinimo chlorokvinu (CQ) (M. Wang *et al.*, 2018). Be to, CQ padidino OxaPt atsparių HCT116 ląstelių jautrumą vaistui (H. Wang *et al.*, 2021).

Nors selektyvios autofagijos receptorius p62 yra plačiai ištirtas vėžio kontekste, tačiau nėra daug duomenų apie jo reikšmę atsparumui. Šiame darbe skyrėme dėmesį p62 raiškos pokyčiams chemoterapiniams vaistams atspariose CRC ląstelėse ir vertinome jo reikšmę 5-FU ir OxaPt indukuotam atsparumui. Nustatėme, kad lyginant su tėvinėmis linijomis HCT116/FU ląstelėse p62 baltymo kiekis yra padidėjęs. Šiuo metu yra žinoma, kad p62 kiekis atspariose ląstelėse priklauso nuo vėžio tipo ar atsparumo vaistui. Kiaušidžių vėžio ir osteosarkomos ląstelėse, pasižyminčiose daugybiniu atsparumu vaistams (MDR, angl. *multidrug resistance*), p62 kiekis yra sumažėjęs lyginant su jautriomis linijomis (J. Wang *et al.*, 2018), o HEP-2 karcinomos ląstelėse, pasižyminčiose MDR, tame tarpe ir 5-FU poveikiui, p62 raiška priešingai – yra padidėjusi lyginant su jautria linija (Battista *et al.*, 2018). Šiame darbe pirmieji nustatėme, kad p62 raiškos tildymas sumažina atsparių HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių gyvybingumą, bet padidina jų metabolinį aktyvumą. Taip pat nustatėme, kad HCT116 ląstelių ir jų sublinijų gyvybingumas po p62 raiškos tildymo mažėja ne dėl jo poveikio ląstelių žūčiai, o dėl išgyvenimą skatinančių molekulių (pvz. IL8) kiekio mažinimo.

GINAMIEJI TEIGINIAI

- 5-FU sukkelto atsparumo HCT116 ląstelėse citokinių transkriptų kiekis padidėja labiau, nei OxaPt sukkelto atsparumo ląstelėse, o 5-FU ir OxaPt didina citokinių transkriptų kiekį prie poveikio neprisitaikiusiose ląstelėse.
- Atspariose CRC ląstelėse serpino B5 kiekis didėja, o 5-FU ir OxaPt jį didina tėvinėse linijose ir sublinijose, kurių atsparumas sukeltas 5-FU.
- ATG12 kiekis yra padidėjęs HCT116/OXA ląstelėse, o po 5-FU ir OxaPt poveikio jo pokytis priklauso nuo ląstelių linijos.
- ATG12 yra svarbus HCT116 ląstelių ir jų sublinijų išgyvenimui bei HCT116 ir HCT116/FU ląstelių atsparumui OxaPt.
- p62 kiekis yra padidėjęs HCT116/FU ląstelėse, o jo kiekio mažėjimas po 5-FU ir OxaPt poveikio koreliuoja su jautrumu vaistui.
- p62 skatina HCT116 ląstelių ir jų sublinijų išgyvenimą bei atsparumą 5-FU ir OxaPt poveikiui.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Kolorektalinio vėžio problematika

Remiantis naujausiais duomenimis, kolorektalinis vėžys (CRC, angl. *colorectal cancer*) yra trečias pagal dažnumą (10 % visų nustatytų vėžinių susirgimų) ir antras pagal mirtingumą (9,4 % visų mirčių nuo vėžio) vėžio tipas pasaulyje ir šio vėžio atvejų daugėja kasmet (Braumuller *et al.*, 2022, Sung *et al.*, 2021). CRC yra labai heterogeniška ligų grupė, kuriai būdingos įvairios mutacijos ir epigenetiniai pokyčiai, o tai sukelia didžiulių iššūkių gydymo metu (Martini *et al.*, 2020). Diagnozavus CRC ankstyvoje stadijoje yra taikomas chirurginis gydymas atskirai arba kartu su chemoterapija ir radioterapija, tačiau pažengusių CRC stadijų atvejais, kai navikas yra metastazavęs, chirurginis gydymas tampa neveiksmingu (El Bali *et al.*, 2021).

CRC gali būti paveldimas (5 %), šeiminis (20 %) arba sporadinis (75 %) (Braumuller *et al.*, 2022). Sporadiniai CRC nėra paveldimi ir išsivysto dėl specifinių taškinių mutacijų, įvykusių skirtinguose genuose. CRC vystosi palaipsniui iš adenomos į karcinomą dėl genetinių ir epigenetinių pokyčių kaupimosi. Šie pokyčiai nustatomi onkogenuose (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF* ir *PIK3CA*), naviką slopinančiuose genuose (*APC*, *TP53*, *SMAD4* ir *PTEN*) ar DNR reparacijos baltymus koduojančiuose genuose (*MSH2/6*, *MLH1*, *PMS1/2*). Šiuose genuose įvykusios mutacijos ar pasikeitusi jų raiška keičia signalinius kelius (WNT/ β -katenino, EGFR, MAPK, TGF- β ir PI3K), kurie yra susiję su ląstelių proliferacija ir išgyvenimu (Braumuller *et al.*, 2022, Marmol *et al.*, 2017).

Sporadinio CRC progresiją lemia genomis nestabilumas, kuris skirstomas į tris patogenezinius mechanizmus: 1) chromosomų nestabilumą (CIN), 2) mikrosatelitų nestabilumą (MSI) ir 3) CpG salų metilinimo fenotipą (CIMP) (Braumuller *et al.*, 2022, Marmol *et al.*, 2017). CIN pasižymi chromosomų skaičiaus disbalansu, todėl vėžinės ląstelės tampa aneuploidinėmis, praranda heterozigotiškumą. CIN būdinga sutrikusi chromosomų segregacija, telomerų disfunkcija ir atsako į DNR pažeidimus pokyčiai, o tai sukelia mutacijas genuose, atsakinguose už tinkamą ląstelės funkcionavimą (Marmol *et al.*, 2017). Dažniausiai pirmoji mutacija, indukuojanti CRC vystymąsi, įvyksta naviką slopinančiame *APC* gene (Aghabozorgi *et al.*, 2019). *APC* baltymas dalyvauja WNT signaliniame kelyje, kuris reguliuoja ląstelių proliferaciją, žūtį, migraciją, autofagiją, chromosomų segregaciją (Zhong *et al.*, 2020). Tolimesnę naviko progresiją lemia aktyvinančios mutacijos, įvykusios onkogenuose *KRAS*, *BRAF* ir *PIK3CA*, kurios aktyvina MAPK ir PI3K signalinius kelius, o tai skatina

ląstelių išgyvenimą ir proliferaciją (Dillon *et al.*, 2021, Rascio *et al.*, 2021). Pažengusio CRC atveju vėžinės ląstelės pasižymi 18q chromosomos heterozigotiškumo praradimu. Įvyksta naviką slopinančių genų *SMAD2*, *SMAD4* ir *DCC* delecija (Malki *et al.*, 2020). SMAD baltymai dalyvauja TGF- β signaliniame kelyje, o jų delecija lemia naviko progresiją, nes skatina augimą, proliferaciją bei slopina apoptozę (Soleimani *et al.*, 2019). Dar viena mutacija, pasitaikanti vėlyvosios stadijos CRC atveju – *TP53* geno mutacija. *TP53* koduoja naviką slopinantį baltymą p53, kurio disfunkcija skatina ląstelių išgyvenimą, proliferaciją, migraciją ir invaziją (Marei *et al.*, 2021). Antras CRC progresiją lemiantis molekulinis mechanizmas – mikrosatelitų nestabilumas (MSI) (Braumuller *et al.*, 2022). MSI atsiranda dėl sutrikusios nekomplementarių nukleotidų reparacijos (MMR). MSI fenotipą dažniausiai lemia *MLH1* geno raiškos praradimas, nes jo geno transkripcija yra nuslopinama hipermetilinus promotorių. Prie MSI atsiradimo prisideda ir kitų MMR dalyvaujančių baltymų, tokių kaip MSH2, MSH6 ir PMS2, funkcijų praradimas (Dedeurwaerdere *et al.*, 2021). Trečias mechanizmas – CpG salų metilinimo fenotipas (CIMP) (Braumuller *et al.*, 2022). CIMP yra epigenetinio nestabilumo forma, lemianti tam tikrų genų promotorių hipermetilinimą, o tai slopina transkripciją. Promotorių hipermetilinimas vėžio atveju yra susijęs su naviką slopinančių genų raiškos nutildymu ir tolimesne naviko progresija. Šiuo būdu yra nutildoma raiška genų, kurių koduojami baltymai dalyvauja DNR reparacijoje, programuotoje ląstelių žūtyje, ląstelės ciklo reguliavime ar naviko invazijoje. CRC atveju yra hipermetilinti *MLH1*, *CDKN2A*, *VIM* (vimetino), *CDH1* (kadherino-1) ar *APC* genų promotoriai (Fatemi *et al.*, 2022). Signaliniai keliai bei baltymai, kurių aktyvumo ir kiekio pokyčiai lemia CRC atsiradimą ir tolimesnę vystymąsi, yra apibendrinti 1.1 pav.

Genų raiška yra susijusi su ląstelių fenotipu ir naviko funkcionavimu, todėl remiantis genetiniais ir epigenetiniais pokyčiais CRC yra klasifikuojamas į keturis sutartinius molekulinis potipius CMS1-4 (Martini *et al.*, 2020):

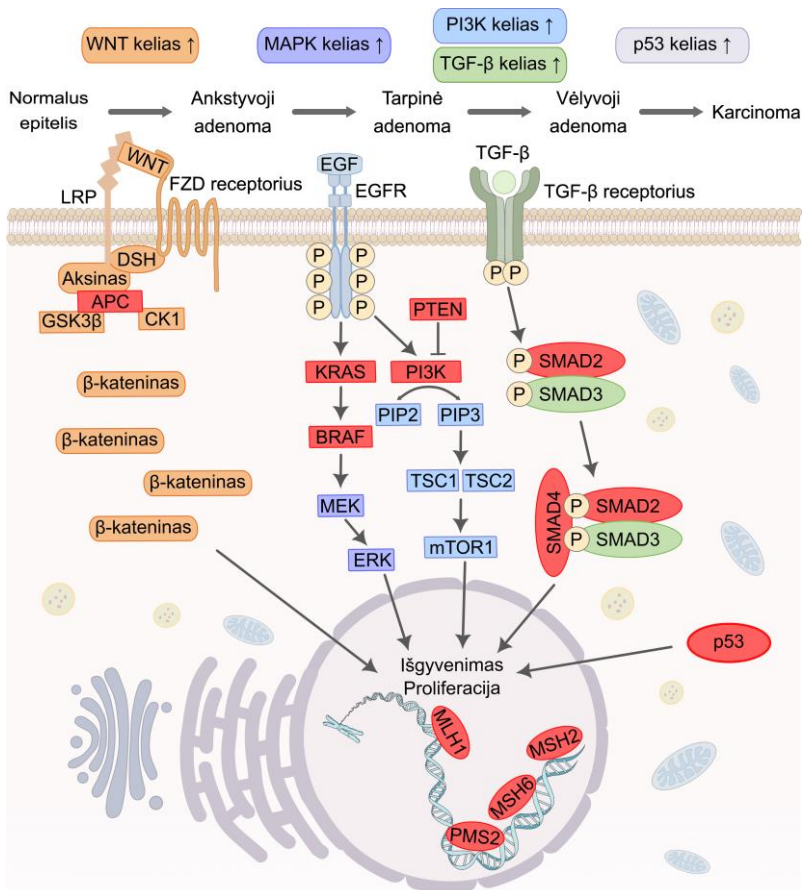
1) CMS1 navikai (MSI imuninis tipas) pasižymi CIMP, MSI, aktyviu imunitetu ir mutavusiu *BRAF*^{V600E} genu;

2) CMS2 navikai (kanoninis tipas) yra epiteliniai, pasižymi CIN ir imuninio atsako nebuvimu, sukelti WNT signalinio kelio ir MYC aktyvacijos, priklauso nuo EGFR signalinio kelio;

3) CMS3 potipiui priklausantys navikai (metabolinis tipas) taip pat yra epiteliniai, tačiau pasižymi pakitusiu metabolismu, mišriu CIN ir MSI bei MAPK signalinio kelio pokyčiais;

4) CMS4 navikai (mezenchiminis tipas) pasižymi CIN ir aktyviais TGF- β

ir VEGFR signaliniais keliais bei nuslopintu imuniniu atsaku (Dienstmann *et al.*, 2017, Martini *et al.*, 2020).



1.1 pav. Kolorektalinio vėžio vystymąsi sukeltys signaliniai keliai. Pažymėti signaliniai keliai: WNT (oranžinė), MAPK (purpurinė), PI3K (mėlyna), TGF-β (žalia). Raudonai pažymėti baltymai, kurių koduojančiuose genuose CRC atveju dažniausiai įvyksta mutacijos. Parengta remiantis Braumuller *et al.*, 2022 ir Marmol *et al.*, 2017.

1.2. 5-FU ir OxaPt veikimo mechanizmai

Ankstyvosios stadijos CRC navikai įprastai yra pašalinami chirurginiu būdu, tačiau metastazavusiam CRC dažniausiai yra taikoma chemoterapija. Priklausomai nuo naviko lokalizacijos ir ligos išsivystymo lygio chirurgija bei chemoterapija gali būti derinama su radioterapija ar imunoterapija (Johdi, Sukor, 2020). CRC imunoterapijai yra naudojami monokloniniai antikūnai arba baltymai, nukreipti prieš EGFR arba prieš VEGF (Marmol *et al.*, 2017, Mohelnikova-Duchonova *et al.*, 2014). Pažengusio (III ir IV stadijos) jau metastazavusio CRC gydymui dažniausiai yra naudojamas chemoterapinis

vaistas 5-fluoruracilas (5-FU), kuris yra derinamas su leukovorinu (foline rūgštimi), bei oksaliplatina (OxaPt) (FOLFOX) ar irinotekanu (FOLFIRI), o kartais visais trimis junginiais vienu metu (FOLFOXIRI). Leukovorinas, OxaPt ir irinotekanas veikia sinergistiškai ir sustiprina 5-FU citotoksiškumą. Naudojant tokias vaistų kombinacijas yra sustabdomas naviko augimas, tačiau vėžinėse ląstelėse dažnai išsivysto atsparumas šiems junginiams (McQuade *et al.*, 2017, Zoetemelk *et al.*, 2020). Chemoterapiniai vaistai veikia skirtingais mechanizmais, tad ir po jų poveikio įgyti atsparumo mechanizmais skiriasi. Pagal veikimo mechanizmą 5-FU yra priskiriamas antimetabolitinių vaistų tipui, o OxaPt – alkilinančių, platinos atomą turinčių vaistų tipui (Bukowski *et al.*, 2020).

1.2.1. 5-FU veikimo mechanizmas

5-FU iki šiol yra pagrindinis chemoterapinis vaistas, naudojamas CRC gydymui (Moutabian *et al.*, 2022). Tai sintetinis pirimidino (uracilo) analogas, kurio penktosios anglies pozicijoje esantis vandenilio atomas yra pakeistas fluoru (Gmeiner, 2020). 5-FU į ląstelę perneša skirtingi membraniniai nukleozidų nešikliai: nukleozidų pusiausvyrą palaikantys nešikliai ENT1 (*SLC29A1*), ENT2 (*SLC29A2*) (Boswell-Casteel, Hays, 2017) ir organinių anijonų nešiklis OAT2 (*SLC22A7*) (Y. Wang *et al.*, 2021). Be to, 5-FU į ląstelę gali patekti ir pasyvios difuzijos būdu (Chalabi-Dchar *et al.*, 2021). Ląstelėje neaktyvus 5-FU verčiamas į tris citotoksiškus metabolitus, veikiančius skirtingais mechanizmais: 1) fluordeoksiuridino trifosfatą (FdUTP), 2) fluoruridino trifosfatą (FUTP) ir 3) fluordeoksiuridino monofosfatą (FdUMP). Šie pirimidinų analogai yra galutiniai reakcijų produktai, kurie ląstelėje pakeičia įprastus pirimidinus (dTTP ir UTP) bei sukelia ląstelės ciklo areštą ir žūtį (Ghafouri-Fard *et al.*, 2021, Very *et al.*, 2018).

5-FU katabolizmas vyksta dviem skirtingais metaboliniais keliais. Pirmasis kelias – 5-FU vertimas į FdUMP (Vodenkova *et al.*, 2020). FdUMP konkuruoja dėl prisijungimo prie timidilato sintazės (TS) aktyviojo centro su natūraliu TS ligandu dUMP. TS katalizuoja dUMP metilinimą ir jo virtimą dTMP. FdUMP sudaro stipresnius kovalentinius ryšius, stabilizuojančius TS kompleksą (Kaiyawet *et al.*, 2013). dTMP yra dTTP substratas ir yra svarbus DNR replikacijai ir reparacijai. Dėl TS stabilizavimo ląstelėje pradeda trūkti dTTP bei kaupiasi dUTP, dėl to padaugėja neteisingai į DNR grandinę įterptų nukleotidų. Galiausiai įvyksta ciklo areštas ir žūtis (Very *et al.*, 2018). 5-FU citotoksiškumas priklauso nuo folatų kiekio, todėl chemoterapijos metu 5-FU yra derinamas su leukovorinu (McQuade *et al.*, 2017). Sumažėjus folatų kiekiui FdUMP prie TS prisijungia silpnai ir dUMP užima savo vietą, o

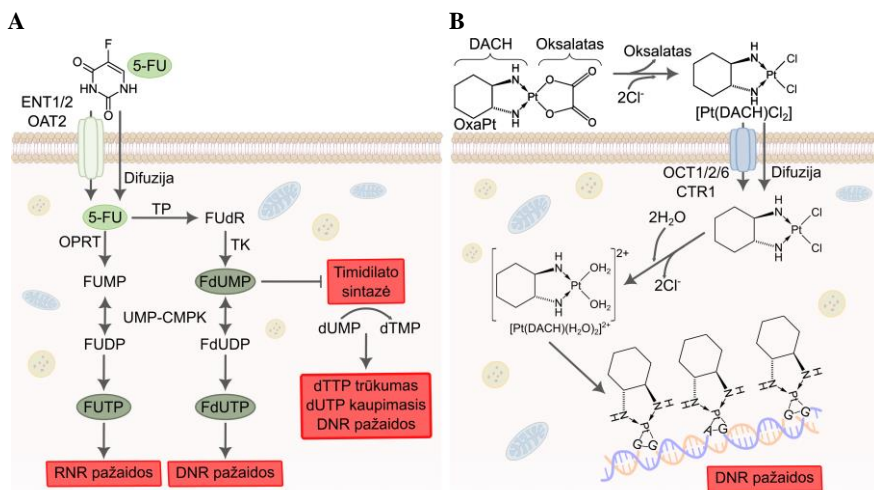
leukovorinas keletą kartų padidina sąveika tarp FdUMP ir TS. Tad leukovorinas sinergistiškai padidina 5-FU citotoksiškumą blokuojant TS veiklą (Glimelius *et al.*, 2021). Dalis FdUMP yra fosforilinamas iki FdUTP, kuris yra DNR polimerazės substratas ir replikacijos ar reparacijos metu yra neteisingai įterpiamas į DNR molekulę vietoj dTTP (Ghafari-Fard *et al.*, 2021). Tam, kad ląstelėje būtų ištaisyti neteisingai į DNR įterpti nukleotidai, yra aktyvinama DNR reparacija. Bazių išplovimo reparacijos (BER) metu timidino DNR glikozilazė gali iškirpti netinkamai įterptus 5-FU metabolitus, tačiau dėl dTTP trūkumo DNR grandinėje kaupiasi trūkiai, dėl kurių yra aktyvinama apoptozė (Kunz *et al.*, 2009). DNR trūkių skaičių padidina ir nekomplementarių nukleotidų reparacijos sistema (MMR) (Sethy, Kundu, 2021).

Antrojo 5-FU metabolinio kelio produktas yra FUTP, kuris yra įterpiamas į įvairaus tipo RNR molekules: informacinę RNR (iRNR), pernašos RNR (tRNR), mažas branduolio RNR (snRNR) ar ribosominę RNR (rRNR) (Chalabi-Dchar *et al.*, 2021). Dėl FUTP įterpimo į RNR molekules keičiasi splaisingas – padaugėja iRNR molekulių su neiškirptais intronais. FUTP neleidžia splaisosomai atpažinti kirpimo vietų arba trukdo iškirpti intronus. Neefektyvų intronų iškirpimą gali lemti ir FUTP, įsiterpęs į snRNR, kurios įeina į splaisosomos sudėtį (Mojardin *et al.*, 2013). FUTP įterpimas į rRNR keičia ribosomų brendimą ir reikšmingai sumažina jų kiekį (Therizols *et al.*, 2022). Nors ribosomos, sudarytos iš fluoruridilintų rRNR molekulių, yra funkcionalios, tačiau pasikeičia jų selektyvumas, kuris priklauso nuo iRNR 5' netransliuojamos srities (5'-UTR) savybių. Trumpas 5'-UTR turinčios iRNR, pavyzdžiui, globino ar GAPDH, yra transliuojamos ne taip efektyviai kaip iRNR, kurių 5'-UTR yra ilgos ir struktūrizuotos (Therizols *et al.*, 2022). Galiausiai antrojo metabolinio kelio tarpinis produktas FUDP gali būti metabolizuojamas į FdUTP, kuris yra klaidingai įterpiamas į DNR grandinę, sukeldamas jos pažaidas, ląstelių ciklo areštą ir žūtį (Very *et al.*, 2018, Zoetemelk *et al.*, 2020). 5-FU veikimo schema pavaizduota 1.2 A pav.

1.2.2. OxaPt veikimo mechanizmas

OxaPt – tai trečios kartos platinos atomą turintis chemoterapinis vaistas, naudojamas metastazavusio CRC gydymui (Perego, Robert, 2016). OxaPt yra derinama su 5-FU ir, veikdama skirtingu mechanizmu nei 5-FU, sustiprina chemoterapinį poveikį (Zoetemelk *et al.*, 2020). Šis vaistas yra priskiriamas alkilinančių vaistų tipui, kurio atstovai savo sudėtyje turi platinos atomą (taip pat cisplatina ir karboplatina) (Bukowski *et al.*, 2020). Vaistas į ląstelę patenka keliais būdais: pasyvia difuzija, palengvinta arba aktyvia pernaša (Buss *et al.*,

2018). OxaPt į ląstelę perneša organinių kationų nešikliai OCT1 (*SLC22A1*), OCT2 (*SLC22A2*) (Buss *et al.*, 2018) ir OCT6 (*POU3F1*) (Oguri *et al.*, 2016), taip pat vario nešiklis CTR1 (*SLC31A1*) (Buss *et al.*, 2018). Pirmiausia, tarpląsteliniame užpilde (ECM) OxaPt ligandas oksalatas yra pakeičiamas dviem chlorido jonais susidarant $[Pt(DACH)Cl_2]$ junginiui, į kurio sudėtį įeina 1,2-diaminocikloheksano (DACH) žiedas. Jam patekus į ląstelę, kur chlorido koncentracija yra apie dešimt kartų mažesnė, junginys yra hidrolizuojamas ir chloro atomai pakeičiami dviem vandens molekulėmis. Susidaro galutinis aktyvus produktas $[Pt(DACH)(H_2O)_2]^{2+}$ (Shoeib, Sharp, 2012). Aktyvi OxaPt jungiasi prie nukleofilinių molekulių, dažniausiai prie DNR, ir sudaro platinos-DNR aduktus. OxaPt taip pat gali jungtis ir prie RNR ar baltymų (Martinez-Balibrea *et al.*, 2015). Aktyvi OxaPt jungiasi prie šalia esančių adeninų arba adenino ir guanino toje pačioje arba skirtingose DNR grandinėse (Kline, El-Deiry, 2013). Adukto sudėtyje esantis didžiulis hidrofobinis DACH žiedas neleidžia MMR sistemos baltymams prisijungti prie DNR pažeidų ir jas ištaisyti, taip sukeliant didesnę citotoksiškumą (Nichetti *et al.*, 2019). OxaPt veikimo mechanizmas pavaizduotas 1.2 B pav.



1.2 pav. 5-FU (A) ir OxaPt (B) veikimo mechanizmai. ENT1/2 ir OAT2 – nukleozidų nešikliai, OPRT – orotato fosforiboziltransferazė, FUMP/FUDP/FUTP – fluoruridino mono/di/trifosfatas, TP – timidino fosforilazė, FdUMP – fluordeoksiuridinas, TK – timidino kinazė, FdUMP/FdUDP/FdUTP – fluordeoksiuridino mono/di/tri fosfatas, UMP-CMPK – uridino/citidino monofosfato kinazė, dUMP/dTMP – deoksiuridino/timidino monofosfatas, DACH – 1,2-diaminocikloheksanas, OAT1/2/6 ir CTR1 – nešikliai. Parengta remiantis Chalabi-Dchar *et al.*, 2021, Very *et al.*, 2018, Kline, El-Deiry 2013, Shoeib, Sharp, 2012.

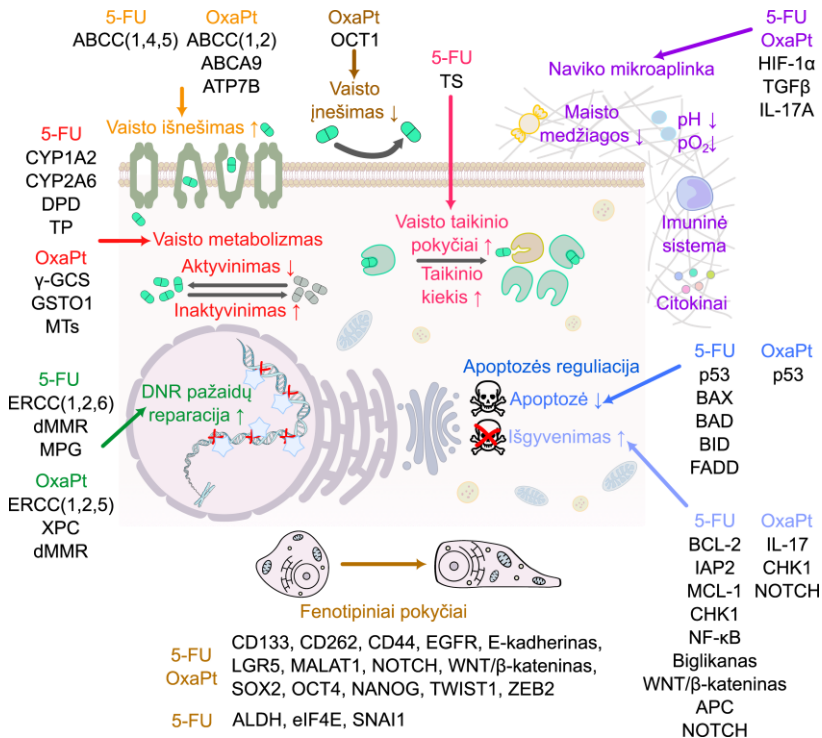
1.3. Atsparumo 5-FU ir OxaPt mechanizmai CRC atveju

Nors šiuo metu vėžio gydymui yra taikomi įvairūs nauji metodai, tačiau chemoterapija išlieka pagrindine pažengusio CRC gydymo strategija (McQuade *et al.*, 2017). Viena iš pagrindinių priežasčių, lemiančių chemoterapijos nesėkmę, yra įgimtas arba gydymo metu įgytas atsparumas vaistams (Bukowski *et al.*, 2020). Net 90 % visų mirčių nuo vėžio yra siejamos su atsparumu (X. Wang *et al.*, 2019). Vaistais paveiktos vėžinės ląstelės geba moduluoti įvairius su išgyvenimu susijusius procesus: ląstelės ciklą bei žūtį, gliukozės metabolizmą, oksidacinį stresą, mitochondrijų aktyvumą, autofagiją, vaistų transportą ir DNR reparaciją (Bukowski *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2021, Marin *et al.*, 2020). Pagrindiniai CRC ląstelėms būdingi atsparumo 5-FU ir OxaPt mechanizmai ir juose dalyvaujantys baltymai apibendrinti 1.3 pav.

Vienas iš apsaugos būdų – **vaisto koncentracijos mažinimas**. Vėžinės ląstelės tai vykdo dviem būdais: slopinant vaisto patekimą arba aktyvinant jo išnešimą (Marin *et al.*, 2020). Atsparumą OxaPt sukelia organinių katijonų nešiklio 1 (OCT1), kuris perneša OxaPt į ląstelę, kiekio sumažėjimas (Buss *et al.*, 2018). 5-FU ir OxaPt atsparumo atvejai dažniau pasitaiko, kai suintensyvėja vaisto išnešimas iš ląstelės, kurį vykdo ATP hidrolizės energiją naudojantys ABC nešikliai (Marin *et al.*, 2020). Atsparumą 5-FU lemiantys nešikliai: ABCB5 (Guo *et al.*, 2018), ABCC4 (MRP4) (Chen *et al.*, 2017) ar ABCC5 (MRP5) (L. Zhang *et al.*, 2019), o OxaPt – ABCB1 (MDR1) (Ghanbarian *et al.*, 2018) ar ATP7B (Martinez-Balibrea *et al.*, 2009). Atsparumą abiem vaistams lemia šie nešikliai: ABCC1 (MRP1) (Cao *et al.*, 2017), ABCC3 (MRP3) (Dong *et al.*, 2017, Kobayashi *et al.*, 2016), ABCC10 (MRP7) (X. Liu *et al.*, 2022, Xie *et al.*, 2017).

Vaistų metabolizmo ir jų taikinių pokyčiai. Kai kurie chemoterapiniai vaistai, tame tarpe ir 5-FU, į ląstelę patenka neaktyvios formos ir turi būti aktyvinami iki citotoksiškų metabolitų (Marin *et al.*, 2020). 5-FU metabolizme dalyvaujančių fermentų aktyvumo ar kiekio pokyčiai sukelia atsparumą (Blondy *et al.*, 2020). CRC ląstelėse atsparumą 5-FU sukelia šių fermentų pokyčiai: UMP kinazės (Humeniuk *et al.*, 2009), OPRT (Durinikova *et al.*, 2018), uridino monofosfato sintetazės (UMPS) (Griffith *et al.*, 2013) ar timidino fosforilazės (TP) (Liu *et al.*, 2018). Kitas atsparumo mechanizmas, susijęs su vaistų pokyčiais – jų inaktyvinimas (Marin *et al.*, 2020). Fermentas dihidropirimidino dehidrogenazė (DPD), katabolizuoja 5-FU iki neaktyvios formos, tad jos kiekio ar aktyvumo padidėjimas sukelia atsparumą (Merloni *et al.*, 2019). 5-FU atspariose CRC ląstelėse padidėjęs citochromo P450 izoformų 1A2 ir 2A6 (CYP1A2 ir CYP2A6) kiekis inaktyvina 5-FU ir sukelia

atsparumą (Untereiner *et al.*, 2018). OxaPt yra inaktyvinama gliutatono S-transferazių, pavyzdžiui, GSTA4 (Z. Zhang *et al.*, 2022), GSTP1 (Y. Zhang *et al.*, 2018) ar GSTO1 (Ramkumar *et al.*, 2016). Atsparumą chemoterapiniams vaistams gali sukelti ne tik pačių vaistų, bet ir jų taikinių pokyčiai (Marin *et al.*, 2020). Atsparumą 5-FU sukelia jo taikinio TS genetiniai pokyčiai ar raiškos padidėjimas (C. Yang *et al.*, 2021, Kurasaka *et al.*, 2021).



1.3 pav. Atsparumo 5-FU ir OxaPt mechanizmai, būdingi CRC ląstelėms. TS – timidilato sintazė, DPD – dihidropirimidino dehidrogenazė, TP – timidino fosforilazė, MTs – metalotioneinai. Parengta remiantis Marin *et al.*, 2020.

DNR reparacijos aktyvinimas. 5-FU ir OxaPt sukelia DNR pažeidimus, dėl kurių yra indukuojamas ląstelės ciklo areštas ir apoptozė (Very *et al.*, 2018). Suaktyvėjusi DNR reparacija pašalina vaistų sukeltus DNR pažeidimus ir taip vėžinės ląstelės išvengia vaistų sukeltos citotoksinio poveikio (Jurkovicova *et al.*, 2022). Su atsparumu 5-FU yra susiję DNR reparacijos baltymai XRCC2 (Zhang *et al.*, 2017), ERCC6 (Zhao *et al.*, 2017), MLH1 (Oliver *et al.*, 2020), XLF (Z. Liu *et al.*, 2019) ar APE1 (Song *et al.*, 2020). OxaPt atsparumu pasižyminčiuose CRC ląstelėse padidėja šių, su DNR reparacija susijusių, baltymų kiekis: ERCC1 (Sreekumar *et al.*, 2021), CHK2 (Hsieh *et al.*, 2022) ar HSP110 (Causse *et al.*, 2019).

Programuotos ląstelės žūties slopinimas. Dar vienas atsparumo chemoterapiniams vaistams mechanizmas – žūties slopinimas. Tai gali vykti dviem būdais – inaktyvinant apoptozę skatinančius baltymus ir/ar sumažinant jų raišką arba atvirkščiai – padidinant apoptozę slopinančių baltymų kiekį ir/ar aktyvumą (Marin *et al.*, 2020). Naviką slopinantis baltymas p53, esant DNR pažaidoms, sukelia ląstelės ciklo areštą ir galiausiai apoptozę, tad mutacijos, įvykusios p53 koduojančiame gene *TP53*, sukelia atsparumą (Hassin, Oren, 2023). Dažnai CRC atveju *TP53* gene nustatomos inaktyvinančios mutacijos, lemiančios atsparumą 5-FU ir OxaPt (Lei *et al.*, 2021, Zhang *et al.*, 2020). Su atsparumu 5-FU taip pat yra susiję apoptozę skatinantys baltymai BAX ir BID, kurių raiška atspariose CRC ląstelėse sumažėja (Manoochetri *et al.*, 2014). Vėžinės ląstelės gali ne tik sumažinti apoptozę indukuojančių baltymų kiekį, bet ir atvirkščiai – aktyvinti signalinius kelius, slopinančius apoptozę ir skatinančius išgyvenimą (Marin *et al.*, 2020). Ląstelės ciklo patikros taško kinazė CHK1 dalyvauja ciklo arešto, DNR pažaidų patikros, DNR reparacijos ir apoptozės reguliavime (Boudny, Trbusek, 2020). CHK1 raiškos padidėjimas yra siejamas su atsparumu 5-FU ir OxaPt poveikiui (Fang *et al.*, 2018, Martino-Echarri *et al.*, 2014). Atsparumą 5-FU poveikiui taip pat lemia padidėjęs apoptozę slopinančių baltymų aktyvumas ir/ar raiška, pavyzdžiui, BCL-2 (Wu *et al.*, 2015), CIAP2 ir XIAP (Manoochetri *et al.*, 2014). CRC ląstelėse yra aktyvūs NF-κB (Korber *et al.*, 2016), NOTCH ar WNT/β-katenino signaliniai keliai (He *et al.*, 2018, Kukcinaviciute *et al.*, 2018), kurie skatina ląstelių išgyvenimą ir yra siejami su atsparumu 5-FU ar OxaPt poveikiui.

Vėžinių ląstelių fenotipiniai pokyčiai taip pat gali lemti atsparumą chemoterapiniams vaistams (Marin *et al.*, 2020). Vienas iš fenotipų, lemiančių atsparumą – vėžio kamieninės ląstelės (CSC). CRC kamieninių ląstelių (CRCSC) gebėjimas sustabdyti ciklą ir išlikti ramybės būsenoje sukelia atsparumą (Chen *et al.*, 2022). Įprastai priešvėžiniai vaistai citotoksiškai veikia intensyviai besidalijančias ląsteles, o ramybės būsenoje esančioms CSC neturi įtakos, kurios vėliau diferencijuoja ir atnaujina naviką (Zhou *et al.*, 2021). Vėžinėms ląstelėms kai kurių CSC bruožų suteikia epitelinio-mezenchiminio virsmo (EMT) indukcija (Filip *et al.*, 2020). EMT lemia išgyvenimo signalinių kelių sutrikimai, kamieniškumo žymenų raiškos padidėjimas ir mutacijos, įvykusios naviką slopinančiuose genuose, o visa tai gali sukelti atsparumą chemoterapiniams vaistams (De Las Rivas *et al.*, 2021, Tanabe *et al.*, 2020). Su atsparumu 5-FU ir/ar OxaPt yra siejami šie CSC žymenys, kurių raiška padidėja atspariose CRC ląstelėse: CD133 (Lee *et al.*, 2015), CD262 (Meng *et al.*, 2016), CD44 ir LGR5 (Pothuraju *et al.*, 2020). Ląstelių išgyvenimą valdančių signalinių kelių pokyčiai gali indukuoti EMT

ir taip pat CRCSC vystymąsi bei sukelti atsparumą priešvėžiniams vaistams (Marin *et al.*, 2020). CRC ląstelėse, įgijusiose į CSC panašių požymių, padidėja EGFR signalinio kelio aktyvumas, lemiantis atsparumą 5-FU ir OxaPt (Qian *et al.*, 2019). Su EMT indukcija ir atsparumu 5-FU ir OxaPt yra susijęs ir NOTCH signalinio kelio aktyvinimas, kurio molekulių raiška, tokių kaip HES1 (Sun *et al.*, 2017), jagged-1 (Kim *et al.*, 2019), ADAM17 (D. D. Li *et al.*, 2018), yra padidėjusi CRC ląstelėse. CRC ląstelėse ubikvitinui specifinė peptidazė 22 (USP22) veikia per WNT/ β -katenino signalinį kelią ir palaiko ląstelių kamieniškumą ir atsparumą 5-FU poveikiui (Jiang *et al.*, 2018). Hedgehog signalinio kelio slopinimas sumažina CRC ląstelių kamieniškumą ir padaro jas jautresnes 5-FU poveikiui (Usui *et al.*, 2018). Galiausiai ląstelių fenotipui ir chemoterapiniam atsparumui įtakos turi ir transkripcijos faktoriai (Marin *et al.*, 2020). Padidėjusi transkripcijos faktoriaus TWIST1 raiška (EMT žymuo) CRC atveju skatina ląstelių proliferaciją ir padidina atsparumą 5-FU ir OxaPt (Zhu *et al.*, 2015). Kitas transkripcijos faktorius SOX2 palaiko CRC ląstelių kamieniškumą, o padidėjusi jo raiška sukelia atsparumą 5-FU ir OxaPt poveikiui (Takeda *et al.*, 2018). Transkripcijos faktorius ZEB2 yra susijęs su CSC plastiškumu ir EMT, o jo kiekio padidėjimas lemia atsparumą 5-FU ir OxaPt (Francescangeli *et al.*, 2020).

1.4. Citokinai

Citokinai – maži baltymai, kurie yra pagrindiniai imuninės sistemos reguliatoriai, leidžiantys imuninėms ląstelėms bendrauti (Waldmann, 2018). Tai dažniausiai sekretuojami baltymai, veikiantys autokriniškai ir parakriniškai (Altan-Bonnet, Mukherjee, 2019). Imuninės sistemos sutrikimai ir citokinų kiekio pokyčiai gali lemti naviko atsiradimą (Shalapour, Karin, 2019). Citokinų raiškos pokyčiai yra siejami ir su CRC progresija (J. Li *et al.*, 2020, Maryam *et al.*, 2023). Vėžinės ląstelės sekretuoja citokinus, kurie autokriniškai skatina pačių vėžinių ląstelių proliferaciją, invaziją, migraciją ir atsparumą priešvėžiniams vaistams. Parakriniškai citokinai veikia naviko mikroaplinkoje esančias ląsteles ir jas perprogramuoja. Taip vėžinės ląstelės apsisaugo nuo sunaikinimo, kurį vykdo imuninės ląstelės, bei skatina angiogenezę (Briukhovetska *et al.*, 2021, Kartikasari *et al.*, 2021, Propper, Balkwill, 2022). Pagrindinės citokinų klasės, reguliuojančios naviko vystymąsi: interleukinai, interferonai, kai kurie naviko nekrozės faktoriaus (TNF) superšeimos nariai, chemokinai ir augimo faktoriai (Propper, Balkwill, 2022). Šiame darbe nagrinėtų citokinų reikšmė ir raiškos pokyčiai CRC ląstelėse apibendrinti 1.1 lentelėje.

1.1 lentelė. Citokinių funkcijos CRC atveju

Citokinas	Funkcijos	Šaltinis
Raiška CRC ląstelėse padidėjusi lyginant su sveiku audiniu		
IL1 α	Skatina angiogenezę, metastazes, citokinių raišką, atsparumą, uždegimą, inhibuoja naviką slopinančių genų raišką	(Cheng <i>et al.</i> , 2021)
IL1 β	Skatina proliferaciją, angiogenezę, metastazes, atsparumą, vėžinių ląstelių kamieniškumą	(Hai Ping <i>et al.</i> , 2016, Rebe, Ghiringhelli, 2020)
IL6	Skatina proliferaciją, migraciją, metastazes, angiogenezę, citokinių raišką	(Turano <i>et al.</i> , 2021, Zeng <i>et al.</i> , 2017)
IL7	Skatina išgyvenimą, proliferaciją, citokinių raišką, metastazes, atsparumą, slopina apoptozę	(Bednarz-Misa <i>et al.</i> , 2019, Krzystek-Korpacka <i>et al.</i> , 2017)
IL8	Skatina išgyvenimą, proliferaciją, invaziją, metastazes, angiogenezę, atsparumą	(Bazzichetto <i>et al.</i> , 2022)
IL13	Skatina proliferaciją, invaziją, metastazes bei slopina žūtį	(Cao <i>et al.</i> , 2016, Cui <i>et al.</i> , 2007)
IL32	Funkcijos priklauso nuo izoformos. Reguliuoja proliferaciją, invaziją, migraciją, angiogenezę, žūtį, citokinių raišką	(Sloot <i>et al.</i> , 2018, Zhai <i>et al.</i> , 2019)
CXCL1	Skatina angiogenezę, proliferaciją, migraciją, slopina žūtį	(Lukaszewicz-Zajac <i>et al.</i> , 2020)
CXCL3	Skatina proliferaciją, invaziją, angiogenezę	(Cui <i>et al.</i> , 2022)
CXCL4	Slopina angiogenezę, bet skatina naviko vystymąsi slopinant imuninį atsaką	(Deng <i>et al.</i> , 2019, X. Yang <i>et al.</i> , 2021, Ortiz Zacarias <i>et al.</i> , 2021)
CXCL5	Skatina angiogenezę, vėžinių ląstelių proliferaciją, migraciją, invaziją ir metastazes	(C. Chen <i>et al.</i> , 2019, Kawamura <i>et al.</i> , 2012)
CXCL10,	Skatina proliferaciją, metastazes, slopina	(Tokunaga <i>et al.</i> , 2018,
CXCL11	angiogenezę	Zhang <i>et al.</i> , 2021)
EGF	Skatina vėžinių ląstelių išgyvenimą, proliferaciją, invaziją, diferenciaciją, metastazes, atsparumą, slopina apoptozę	(Abdulla <i>et al.</i> , 2021, Martini <i>et al.</i> , 2020)
TNF	Priklauso nuo sąlygų: gali indukuoti apoptozę, nekrotozę, uždegimą ar išgyvenimą	(Al Obeed <i>et al.</i> , 2014, Moatti, Cohen, 2021)
Raiška CRC ląstelėse sumažėjusi lyginant su sveiku audiniu		
IL10	Gali skatinti arba slopinti CRC vystymąsi, slopinti imuninę sistemą	(Cacev <i>et al.</i> , 2008, J. Li <i>et al.</i> , 2020, Wei <i>et al.</i> , 2020)
IL12A,	Reguliuoja imuninių ląstelių veiklą ir slopina	(Mager <i>et al.</i> , 2016,
IL12B	naviko vystymąsi	Mirlekar, Pylayeva-Gupta, 2021)
IL18	Slopina naviko vystymąsi, proliferaciją	(Cui <i>et al.</i> , 2007, Feng <i>et al.</i> , 2020)
Nėra duomenų apie raiškos pokyčius CRC atveju		
CCL25	Slopina invaziją ir metastazes, susijęs su atsparumu apoptozei ir vaistams, skatina ląstelių proliferaciją	(Korbecki <i>et al.</i> , 2020, C. Wang <i>et al.</i> , 2018, B. Xu <i>et al.</i> , 2020)

Vieni iš pagrindinių citokinų raiškos aktyvatorių yra transkripcijos faktorių NF- κ B šeimos nariai, kuriuos aktyvina įvairūs molekuliniai veiksniai, tame tarpe ir patys citokinai, pavyzdžiui, IL1 β , TNF α , IL12, IL17, IL33, o NF- κ B indukuoja IL1 α ir β , IL2, IL6, IL8, IL12, IL17, TNF α , IFN- β ir γ , CCL5 koduojančių genų raišką (Mussbacher *et al.*, 2019). NF- κ B baltymai yra svarbūs CRC vystymuisi, nes skatina vėžinių ląstelių išgyvenimą, proliferaciją, invaziją, migraciją, angiogenezę ir slopina apoptozę (Martin *et al.*, 2021, Patel *et al.*, 2018). NF- κ B indukuoja raišką genų, kurie koduoja apoptozę slopinančius (BAG-1, BCL-2, BCL-xL, cFLIP, cIAP2), bei uždegimą (TNF α , IL6, IL1 β) ir angiogenezę skatinančius (HIF-1 α , VEGF, IL8) baltymus (Patel *et al.*, 2018). Pastovus NF- κ B aktyvumas CRC atveju siejamas su vėlesnėmis vėžio stadijomis, atsparumu ir prastu pacientų išgyvenimu (Vaiopoulos *et al.*, 2013, Zhou *et al.*, 2018).

Padidėjęs NF- κ B aktyvumas ir pasikeitusi citokinų raiška lemia atsparumą chemoterapiniams vaistams (Jones *et al.*, 2016, Madden *et al.*, 2020) (1.2 lentelė). Padidėjęs IL1 β kiekis etopozidui atspariose kasos vėžio ląstelėse apsaugo ląsteles nuo vaisto poveikio, nes slopina kaspazių-3/7/8/9 aktyvumą (Muerkoster *et al.*, 2006). CRC ląstelių mikroaplinkoje padidėjęs IL1 β kiekis sukelia atsparumą 5-FU, nes slopina apoptozę bei lemia NF- κ B inhibitoriaus I κ B α fosforilinimą ir jo degradaciją proteasomose, o tai sukelia NF- κ B aktyvinimą, bei didina IL8 sekreciją (Spagnardi *et al.*, 2022). Padidėjęs IL4 ir IL10 baltymų kiekis MDR pasižyminčiose skydliaukės vėžio ląstelėse lemia atsparumą cisplatinai, doksorubicinui ir taksoliui, nes didina apoptozę slopinančių BCL-2 ir BCL-xL baltymų kiekį (Stassi *et al.*, 2003). Enzalutamidui atspariose prostatos vėžio ląstelėse IL6 aktyvina STAT3 ir androgeno receptoriaus signalinius kelius, lemiančius vėžinių ląstelių progresiją, metastazes ir atsparumą (Liu *et al.*, 2014). Padidėjęs IL6 ir IL8 kiekis krūties vėžio ląstelėse sukelia atsparumą doksorubicinui, 5-FU, paklitakseliui ir vinkristinui. Šiose ląstelėse taip pat yra padidėjęs vaistus iš ląstelių išnešančių nešiklių MDR1 (*ABCB1*) ir MRP1 (*ABCC1*) baltymų kiekis (Shi *et al.*, 2012). Šių nešiklių kiekio padidėjimas yra siejamas su citokinų kiekio padidėjimu (Du *et al.*, 2018). Doksorubicinui atspariose CRC ląstelėse padidėjęs IL8 kiekis lemia nuo IKK- β (slopina I κ B α) priklausomą NF- κ B (p65) aktyvinimą, dėl kurio yra indukuojama MDR1 baltymą koduojančio geno *ABCB1* raiška, sukelianti atsparumą (Du *et al.*, 2018). Uždegimą skatinantis IL17 yra susijęs su atsparumu cisplatinai, o jo kiekis yra padidėjęs CRC ląstelėse lyginant su sveiku audiniu. CRC ląstelėse IL17 sumažina cisplatinos sukeltą citotoksiškumą, nes slopina apoptozę: didina apoptozę slopinančių p-AKT ir BCL-2 baltymų kiekį, bei mažina apoptozę skatinančio BAX baltymo kiekį (Sui *et al.*, 2019). Skrandžio vėžio ląstelėse

padidėjęs CCL2 kiekis sukelia atsparumą cisplatinai. CCL2 lemia sumažėjusį c-PARP1 aktyvumą, bet aktyvina PI3K-AKT-mTOR signalinį kelią, dėl ko yra slopinama ląstelių žūtį sukelianti autofagija bei padidėja p62 kiekis. p62 toliau aktyvina NF-κB ir per teigiamą grįžtamąjį ryšį didina paties CCL2 kiekį (Xu *et al.*, 2018). Krūties vėžio ląstelėse padidėjęs CCL5 kiekis lemia atsparumą tamoksifenui. CCL5 aktyvina STAT3 signalinį kelią, kuris grįžtamojo ryšio kilpa didina paties CCL5 kiekį. CCL5-STAT3 signalinis kelias slopina apoptozę didinant apoptozę slopinančių baltymų BCL-2 ir BCL-xL kiekį, bei mažinant PARP ir kaspazės-9 aktyvinimą (Yi *et al.*, 2013). Apibendrinant – citokinai sukelia atsparumą slopinami apoptozę arba indukuodami vaistų išnešimą vykdančių nešiklių raišką ir išgyvenimą skatinančius signalinius kelius (Jones *et al.*, 2016, Madden *et al.*, 2020).

1.2 lentelė. Citokinių sukeltas atsparumas priešvėžiniams vaistams

Citokinas	Vėžio tipas	Atsparumas	Mechanizmas	Šaltinis
IL1β	Kasos	Etopozidui	Kaspazių-3/7/8/9 aktyvumas ↓	(Muerkoster <i>et al.</i> , 2006)
IL1β	Kolorektalinio	5-FU	Apoptozė ↓ NF-κB ↑ IL8 sekrecija ↑	(Spagnardi <i>et al.</i> , 2022)
IL4, IL10	Skydliaukės	MDR	Apoptozė ↓	(Stassi <i>et al.</i> , 2003)
IL6	Prostatos	Enzalutamidui	STAT3 ↑ ir AR ↑	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
IL6, IL8	Krūties	MDR	MDR1 ↑ MRP1 ↑	(Shi <i>et al.</i> , 2012)
IL8	Kolorektalinio	Doksorubicinui	NF-κB ↑; MDR1 ↑;	(Du <i>et al.</i> , 2018)
IL17	Kolorektalinio	Cisplatinai	Apoptozė ↓	(Sui <i>et al.</i> , 2019)
CCL2	Skrandžio	Cisplatinai	Apoptozė ir autofagija ↓ p62-NF-κB ↑; CCL2 ↑	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
CCL5	Krūties	Tamoksifenui	Apoptozė ↓ STAT3 ↑	(Yi <i>et al.</i> , 2013)

↑ – kiekio/proceso didėjimas/aktyvinimas; ↓ – kiekio/proceso mažėjimas/slopinimas.

AR – androgeno receptoriaus signalinis kelias.

1.5. Serpinai

Serino proteazių inhibitoriai (serpinai) yra gausiausia proteazių inhibitorių grupės superšeima. Jie yra svarbūs angiogenezės, uždegimo reguliacijai, audinių persitvarkymui, gali kontroliuoti programuotą ląstelių žūtį ar ląstelių vystymąsi. Sutrikusios serpinų funkcijos yra siejamos su įvairiomis ligomis, tame tarpe ir su vėžiu (Maas, de Maat, 2021, Mkaouar *et al.*, 2019). Serpinai pasižymi panašia struktūra, kurią sudaro trys β-klostės, aštuonios-devynios α-spiralės ir aktyvioji centro kilpa, kuri specifiskai reguliuoja proteazių prijungimą ir slopinimą. Serpinai proteazes slopina negrįžtamai. Slopinimo

metu proteazė hidrolizuoja serpino aktyviają centro kilpą, o tai lemia konformacinius pokyčius abiejose molekulėse, dėl kurių susidaro stabilus serpino-proteazės kompleksas (Marijanovic *et al.*, 2019). Visi serpinai, išskyrus B grupę, yra sekretuojami ir veikia ECM, o B grupės serpinai neturi sekrecijai būtinos N-galo signalinės sekos, todėl yra viduląsteliniai (Askew, Silverman, 2008, Paczek, Mroczko, 2022). Serpinai pagal funkcijas yra skirstomi į slopinančius ir šia funkcija nepasižyminčius serpinus (Sanrattana *et al.*, 2019, Wilkinson, 2021). Šiame darbe tirti serpinai E1, E2, B1 ir B5.

Serpinas E1 (SE1), dar kitaip vadinamas plazminogeno aktyvatoriaus inhibitorius-1 (PAI-1) – labiausiai ištirtas serpinas vėžio kontekste (Paczek, Mroczko, 2022). SE1 taikiniai yra audinių (tPA) ir urokinazės (uPA) plazminogeno aktyvatoriai (Wilkinson, 2021). tPA ir uPA ECM esantį plazminogeną verčia aktyviu plazminu, kuris skaido ECM. Plazminogeno aktyvatoriai (tPA ir uPA), inhibitoriai (SE1 ir SB1) bei receptoriai sudaro plazminogeno aktyvinimo sistemą. Šios sistemos narių raiškos pokyčiai vėžinėse ląstelėse keičia naviko mikroaplinką ir palaiko augimą skatinančius signalus. Plazminogeno aktyvinimo sistema turi įtakos vėžinių ląstelių augimui, invazijai, metastazavimui ir chemoterapinių vaistų sukeltam atsparumui (Bharadwaj *et al.*, 2021). Nors SE1 slopina plazminogeno virtimą plazminu ir ECM persitvarkymą, jo kiekio padidėjimas vėžinėse ląstelėse dažnai koreliuoja su bloga vėžiu sergančių pacientų baigtimi. SE1 skatina tam tikrų tipų navikų vystymąsi, nes yra svarbus ląstelių migracijai, invazijai, proliferacijai ir kraujagyslių susidarymui (Kubala, DeClerck, 2019, S. Li *et al.*, 2018). CRC atveju SE1 kiekis yra padidėjęs ir dar labiau išauga esant metastazėms, o jo raiškos nuslopinimas sumažina ląstelių gyvybingumą (Chen *et al.*, 2015). SE1 skatindamas ECM metalo proteinazės 13 (MMP-13) raišką ir sekreciją osteosarkomos ląstelėse skatina jų invaziją ir metastazavimą (Hirahata *et al.*, 2016). SE1 per PI3K/AKT signalinį kelią skatina galvos ir kaklo vėžio ląsteles migruoti ir padaro jas atsparias cisplatinos sukeltai apoptozei (Pavon *et al.*, 2015). Taip pat SE1 per CCL5/CCR5 signalinį kelią indukuoja trigubai neigiamų krūties vėžio ląstelių migraciją (W. Zhang *et al.*, 2018). Esant hipoksinėms sąlygoms HIF-2 α didina SE1 kiekį, kuris mažindamas plazmino kiekį indukuoja angiogenezę (Geis *et al.*, 2015). Paties SE1 raiška yra reguliuojama įvairių veiksnių, kurie taip pat prisideda prie naviko vystymosi: augimo faktorių (EGF, TGF- β), citokinų (IL6, TNF α , IL1 α) ar tam tikrų streso veiksnių, pavyzdžiui, hipoksijos (HIF-1 α) (S. Li *et al.*, 2018).

Serpino E2 (SE2), dar vadinamo proteaze neksinu-1 (PN-1), pagrindiniai taikiniai yra trombinas, tPA ir uPA (Wilkinson, 2021). Fiziologiškai SE2 yra svarbus angiogenezei, ECM persitvarkymui ir kraujo krešėjimui (Monard,

2017), o vėžinėse ląstelėse – metastazavimui, invazijai, proliferacijai, angiogenezei ir apoptozei (Y. Yang *et al.*, 2018). SE2 kiekis yra padidėjęs daugelyje navikų, tame tarpe ir CRC (Y. Yang *et al.*, 2018). CRC atveju SE2 kiekis yra padidėjęs ląstelėse, turinčiose mutacijas *KRAS* arba *BRAF* genuose. RAS/RAF/MEK/ERK signalinis kelias, kurio dalyviai yra *KRAS* ir *BRAF*, indukuoja SE2 raišką. CRC ląstelėse SE2 yra susijęs su ląstelių proliferacija, invazija ir migracija (Bergeron *et al.*, 2010). SE2 taip pat yra susijęs su atsparumu priešvėžiniams vaistams bortezomibui ir doksorubicinui bei didina ląstelės ciklo baltymų ciklino D1 ir CDK4 kiekį osteosarkomos ląstelėse (Mao, Wang, 2016). SE2 turi įtakos DNR reparacijai taip prisidėdamas ir prie plaučių vėžio ląstelių atsparumo radioterapijai, be to, yra svarbus šių ląstelių invazyvumui ir metastazavimui (J. Zhang *et al.*, 2022). Krūties vėžio ląstelėse EGF/PKC/MAPK/EGR1 signalinio kelio aktyvinimas didina SE2 kiekį, kuris skatina šių ląstelių invaziją, migraciją ir kamieniškumą (Tang *et al.*, 2019).

Serpino B1 (SB1), dar kitaip vadinamo leukocitų elastazės inhibitoriumi, taikiniai yra neutrofilų elastazė, katepsinai G ir L bei proteinazė-3 (Wilkinson, 2021). SB1 neturi sekretinės signalinės sekos todėl yra citoplazminis baltymas (Pemberton, 2020). SB1 dažniausiai yra ekspresuojamas imuninių ląstelių nors jo raiška nustatoma ir kitų tipų ląstelėse (Torriglia *et al.*, 2017). Pagrindinė SB1 funkcija – apsaugoti ląsteles nuo streso metu į citoplazmą išsiliejusių proteazių, kurios gali sukelti uždegimą ir ląstelių žūtį (Majewski *et al.*, 2016) SB1 slopina uždegimines kaspazes-1, 4 ir 5, kurios indukuoja ląstelių žūtį – piroptozę. SB1 kaspazes slopina ne per aktyviojo centro kilpą, o per C-gale esantį CARD domeną prijungiantį motyvą (Choi *et al.*, 2019). Kita ląstelių žūtis, kurią gali indukuoti SB1 – nuo kaspazių nepriklausoma apoptozė. Jos metu SB1 yra hidrolizuojamas, virsta endonukleaze L-DNaze II, kuri keliauja į branduolį ir skaido DNR (Jaadane *et al.*, 2014, Torriglia *et al.*, 2017). SB1 raiška yra nustatoma ir vėžinėse ląstelėse, tačiau duomenų apie jo reikšmę vėžio vystymuisi nėra daug. Žinoma, kad SB1 kiekis yra sumažėjęs prostatos (Lerman *et al.*, 2019), gliomos (Huasong *et al.*, 2015) atvejais, o tai skatina vėžinių ląstelių proliferaciją, invaziją ir migraciją.

Serpinas B5 (SB5), dar žinomas kaip maspinas, yra netipinis, slopinimo funkcijų neatliekantis serpinų šeimos narys (Bodenstine *et al.*, 2012, Wilkinson, 2021). Kitaip nei proteazes slopinantys serpinai, SB5 turi sutrumpėjusią hidrofobinę RCL, todėl negali prisijungti proteazių (Gurzu, Jung, 2021). SB5 yra ekspresuojamas daugelyje audinių ar organų, o navikuose jo raiška gali būti tiek padidėjusi, tiek sumažėjusi (Baniyas *et al.*, 2019). Padidėjusi SB5 raiška nustatyta CRC, kasos, tulžies pūslės ir skydliaukės, o sumažėjusi – krūties, prostatos, skrandžio ir melanomos vėžio atvejais (Q. Yang *et al.*, 2018). Vėžinėse ląstelėse SB5 raišką gali indukuoti

TGF- β 1 nuo SMAD2/3 priklausomu ir nuo SMAD nepriklausomais signaliniais keliais per p38-MAPK ir MEK1/2 (Wongnoppavich *et al.*, 2017). SB5 geno raišką aktyvina ir PTEN-p53, kurie jungiasi prie SB5 geno promotoriaus (Collaud *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2019).

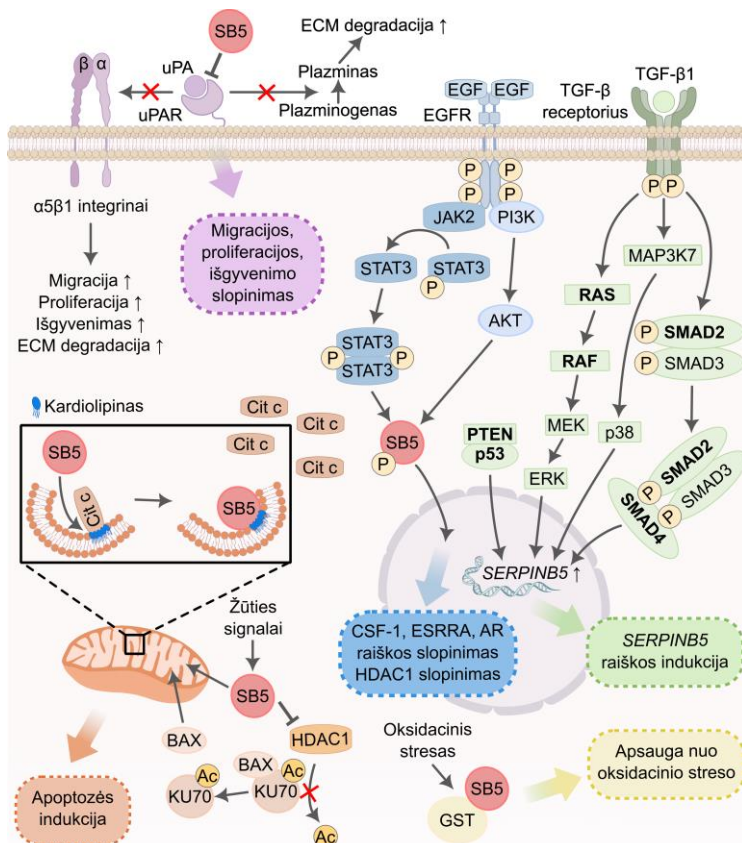
Fiziologinėmis sąlygomis SB5 palaiko normalią ląstelių homeostazę, slopina ląstelių invaziją ir angiogenezę, reguliuoja apoptozę, adheziją, atsaką į oksidacinį stresą, palaiko proteasomų funkcijas, slopina uPA ir tPA, o vėžinėse ląstelėse moduliuoja ląstelių migraciją, invaziją, adheziją, apoptozę ir angiogenezę (Chen, Yates, 2006, Gurzu, Jung, 2021). SB5 funkcijos priklauso nuo jo lokalizacijos. Jis gali būti ECM, plazminėje membranoje, citoplazmoje, branduolyje ar sekrecinėse pūslelėse (Gurzu, Jung, 2021). SB5 funkcijos apibendrintos 1.4 pav.

Tarpląsteliniam užpilde SB5 prisijungia prie iš uPA ir jo receptoriaus (uPAR) sudaryto komplekso, o tai lemia komplekso internalizaciją. Dėl to sumažėja aktyvaus plazmino kiekis ir ląstelių migracija, nes plazminas skaido ECM ir didina ląstelių judrumą (Fortenberry, 2015). Vėžinėse ląstelėse uPA-uPAR kompleksas sąveikauja su integriniais ir aktyvina viduląstelinis signalinius kelius, skatinančius ląstelių migraciją, proliferaciją, išgyvenimą, angiogenezę ir ECM degradaciją. Padidėjusi SB5 koncentracija ECM lemia šių procesų slopinimą (Fodor *et al.*, 2020).

Citoplazmoje SB5 oksidacinio streso metu sąveikaudamas su glutathione-S-transferaze (GST) didina jos aktyvumą ir mažina ROS kiekį (Gurzu, Jung, 2021, Yin *et al.*, 2005). Ląstelėje atsiradus apoptozę skatinančių signalų SB5 iš citozolio gali būti perkeltas į mitochondrijas. Jose SB5 konkuruoja su citochromu c, esančiu ant vidinės mitochondrijos membranos, ir su didesniu afiniškumu prisijungia prie fosfolipido – kardiolipino. SB5 prie neigiamą krūvį turinčio kardiolipino jungiasi per savo teigiamai įkrautą regioną, sudarytą iš lizino liekanų. Laisvas citochromas c patenka į citozolį ir indukuoja apoptozę (Mahajan *et al.*, 2019). SB5 gali indukuoti apoptozę ir per histonų deacetilazės 1 (HDAC1) slopinimą. HDAC1 deacetilina apoptozę slopinantį baltymą KU70, kuris yra prisijungęs apoptozę skatinantį baltymą BAX. HDAC1 slopinimas lemia KU70 acetilinimą ir BAX disociaciją, jo translokaciją į mitochondrijas ir apoptozės indukciją (Lee *et al.*, 2012).

Branduolyje esantis SB5 yra susijęs su genų raiškos reguliacija (Reina *et al.*, 2019). SB5 yra mažas 42 kDa baltymas, kuris į branduolį gali patekti pasyvia difuzija per poras, be to turi branduolio lokalizacijos seką (NLS) (Reina *et al.*, 2019). NLS yra dalinai paslėpta, tad SB5 pernašai į branduolį reikalingi konformaciniai pokyčiai, kuriuos sukelia SB5 tirozino liekanų fosforilinimas. SB5 fosforilinimas priklauso nuo EGF-EGFR aktyvinamų signalinių kelių – PI3K-AKT ir JAK2-STAT3 (Longhi *et al.*, 2021).

Branduolyje SB5 gali jungtis prie naviko progresijai svarbių genų *CSF-1*, *ESRRA* (Goulet *et al.*, 2011) ir androgeno receptoriaus (Tang *et al.*, 2020) promotorių ir slopinti jų raišką. SB5 reguliuoja genų raišką tiesiogiai prisijungdamas ir slopindamas HDAC1, kurio taikiniai vėžinėse ląstelėse gali būti ciklinas D1, p21, MMP9 ir vimetinas (Li *et al.*, 2006, Lin *et al.*, 2019, Tamazato Longhi *et al.*, 2016).



1.4 pav. Serpino B5 (SB5) raiškos indukcija ir funkcijos. SB5 lokalizuojasi branduolyje, citoplazmoje ir tarpląsteliniam užpilde (ECM). Pastorintu šriftu nurodyti baltymai, kurių koduojančiuose genuose CRC atveju dažniausiai įvyksta mutacijos. Cit c – citochromas c, Ac – acetilinimas, P – fosforilinimas. Parengta remiantis Lin *et al.*, 2019, Wongnoppavich *et al.*, 2017, Collaud *et al.*, 2015, Fodor *et al.*, 2020, Gurzu, Jung, 2021, Mahajan *et al.*, 2019, Lee *et al.*, 2012, Longhi *et al.*, 2021, Goulet *et al.*, 2011, Tang *et al.*, 2020.

1.6. Autofagija

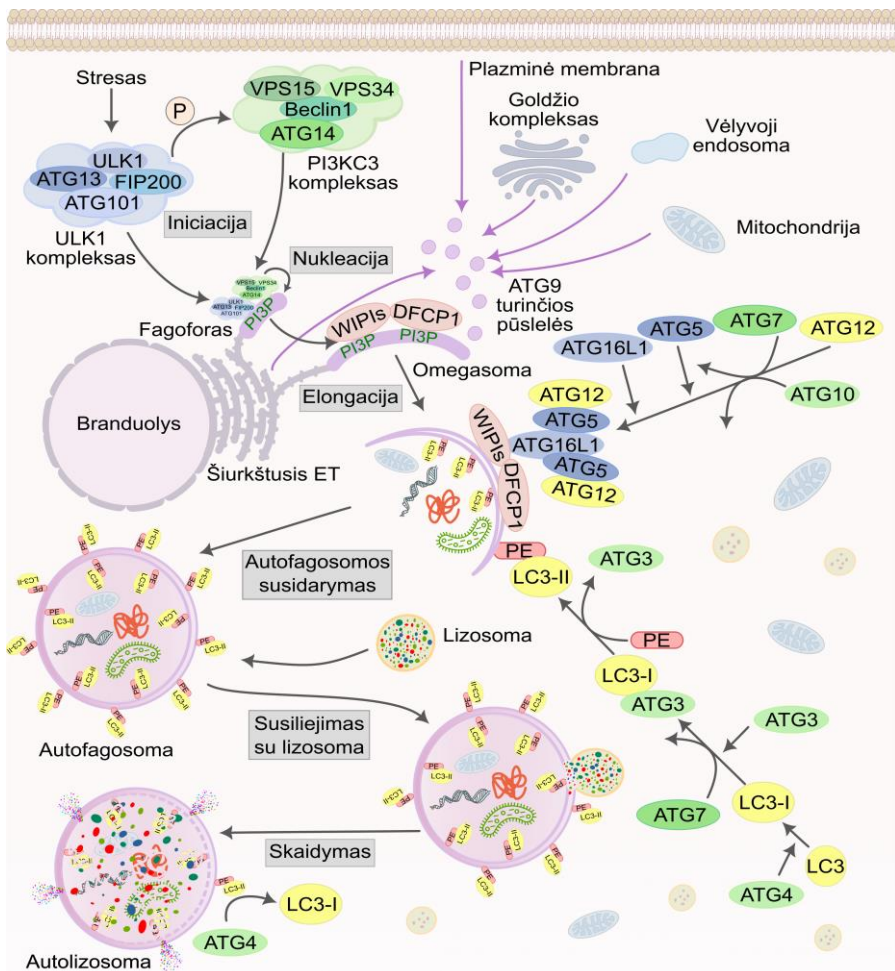
1.6.1. Autofaginių membranų biogenezė

Makroautofagija (toliau autofagija) – tai eukariotinių ląstelių homeostazės palaikymo procesas, kurio metu viduląsteliniai komponentai, tokie kaip

organelės, baltymų agregatai, patogenai, makromolekulės, yra apgaubiami dvigubą membraną turinčių pūslelių ir nunešami į lizosomas degradacijai (S. Kumar *et al.*, 2021). Fiziologinėmis sąlygomis autofagija vyksta baziniu lygiu, kuris skiriasi tarp ląstelių tipų. Bazinės autofagijos metu yra suskaidomos nereikalingos organelės, ilgai gyvuojantys baltymai, palaikoma bendra ląstelių homeostazė (Klionsky *et al.*, 2021). Evoliuciškai autofagijos paskirtis yra apsaugoti ląstelę nuo nepalankių sąlygų, pavyzdžiui, maisto medžiagų trūkumo, oksidacinio streso, hipoksijos ar patogenų invazijos (X. Li *et al.*, 2020).

Aktyvius autofagiją fagoforo surinkimo vietoje, kuri yra ant šiurkščiojo endoplazminio tinklo (ET), susidaro mažos plokščios membraninės struktūros, vadinamos fagoforais. Toliau fagoforai tūsta, apvalėja – susidaro omegasomos, kurios didėdamos apgaubia citoplazminį turinį. Omegasomos didėja tol, kol užsidaro susidarant dvigubą membraną turinčioms pūslelėms – autofagosomoms. Autofaginės membranos susidaro iš ATG9 baltymų turinčių pūslelių, kurių šaltinis yra kitos membraninės organelės: plazminė membrana, Goldžio kompleksas, mitochondrijos, endosomos ir ET. Autofagosomoms susiliejus su lizosomomis susidaro autolizosomos. Galiausiai autolizosomų turinys kartu su vidine membrana yra suskaidomi lizosomų hidrolazių, o hidrolizės produktai yra grąžinami atgal į citoplazmą ir panaudojami naujų molekulių ar organelių atnaujinimui (Dikic, Elazar, 2018).

Pagal molekulinis mechanizmus autofagija yra skirstoma į kelias stadijas: 1) iniciaciją, 2) fagoforo užuomazgos susidarymą, 3) fagoforo/omegasomos elongaciją, 4) autofagosomos susidarymą, 5) susiliejamą su lizosomomis ir 6) krovinių suskaidymą. Autofagiją inicijuoja ULK kinazės kompleksas, sudarytas iš ATG13, FIP200, ATG101 ir ULK1 arba ULK2 baltymų. Esant įprastoms sąlygoms pagrindinis autofagijos inhibitorius mTORC1 fosforilina ATG13 ir ULK1/2, taip slopindamas iniciaciją. Aplinkoje atsiradus autofagiją skatinantiems signalams mTORC1 yra slopinimas ir susiformuoja baltymų platforma, sudaryta iš ULK kompleksų, kurie pritraukia ATG baltymus ir juos fosforilina. ULK kompleksas tiesiogiai fosforilina ATG4B, ATG9, ATG14 ir kitus su autofagija susijusius baltymus, kurie yra svarbūs autofagosomų biogenezei. Antrai autofagijos stadijai – fagoforo membranos užuomazgos susidarymui yra svarbus III klasės fosfatidilinozitol-3-kinazės kompleksas (PI3KC3), sudarytas iš VPS34 (PIK3C3), VPS15 (PIK3R4), Beclin-1 ir ATG14 baltymų. Šis kompleksas fagoforo membranoje esantį fosfatidilinozitolį verčia į fosfatidilinozitolio 3-fosfatą (PI3P), kuris pritraukia autofagosomų biogenezei svarbius baltymus. Prie PI3P prisijungia DFCP1 ir WIPI1-4 baltymai, kurie skirtingu afiniškumu pritraukia ATG2.



1.5 pav. Autofagosomų biogenezė. LC3 – pirminė LC3 forma, LC3-I – citoplazminė LC3 forma, LC3-II – prie autofagosomų membranų prijungta lipidinė LC3 forma, PI3P – fosfatidilinozitolio 3-fosfatas, PE – fosfatidiletanolaminas. Parengta remiantis Dikic, Elazar, 2018 ir Xu *et al.* 2020.

Fagoforo elongacijai yra svarbios dvi į ubikvitino sistemą panašios baltymų sistemos: ATG12 ir LC3. Vienos iš šių sistemų veikimo metu, į ubikvitiną panašus baltymas ATG12 sudaro izopeptidinį ryšį su ATG5. Šią reakciją vykdo E1 tipo fermentas ATG7 ir E2 tipo fermentas ATG10. Galiausiai du ATG5-ATG12 konjugatai prisijungia prie ATG16L1 duplekso ir susidaro šešių baltymų kompleksas (ATG16L1 kompleksas), kuris per ATG16L1 jungiasi prie WIP1 baltymo, esančio ant fagoforo membranos. ATG16L1 kompleksas atlieka E3 tipo fermento funkciją prijungiant LC3 baltymą prie autofaginėse membranose esančio fosfatidiletanolamino (PE). Antrosios į ubikvitino sistemą panašios autofaginių baltymų sistemos veikimo

metu PE yra kovalentiškai prijungiamas prie ATG8 šeimos baltymų, kuriems priklauso LC3 ir GABARAP baltymai. Pirmiausia ATG8 šeimos baltymai C gale yra hidrolizuojami ATG4 proteazės, kad būtų atidengta glicino liekana. Tada ATG7, ATG3 ir ATG16L1 kompleksas, veikdami vienas paskui kitą, prijungia ATG8 šeimos baltymus prie fagoforo membranoje esančio PE amino grupės. Autofaginėse membranose esantys ATG8 šeimos baltymai yra svarbūs autofagosomos susidarymui, susiliejimui su lizosomomis ir selektyvios autofagijos receptoriaus pažymėto krovinio atpažinimui (1.7 skyrius) (Hansen *et al.*, 2018, X. Li *et al.*, 2020, Nakatogawa, 2020, J. L. Xu *et al.*, 2020). Autofagosomų biogenezės schema pavaizduota 1.5 pav.

1.6.2. Autofagijos reikšmė vėžiui ir atsparumui

Autofagija atlieka dvigubą vaidmenį vėžio vystymesi (Lim *et al.*, 2021, Singh *et al.*, 2018). Kol ląstelės yra sveikos, autofagija įvairiais mechanizmais slopina ląstelių transformaciją į vėžines (Rybstein *et al.*, 2018). Vienas iš apsaugos mechanizmų yra pažeistų mitochondrijų pašalinimas, kurios yra pagrindinis ROS šaltinis. ROS pažeidžia įvairias makromolekules (baltymus, lipidus bei DNR) ir vietoj ląstelių žūties gali būti indukuojamas naviko vystymasis (Laura *et al.*, 2015). ROS taip pat skatina uždegimo molekulių, tokių kaip IL1 β ar IL18, sekreciją (Checa, Aran, 2020), o tai taip pat gali daryti teigiamą įtaką vėžio vystymuisi (1.4 skyrius). Dar vienas autofagijos būdas apsaugoti sveikas ląsteles – patogenų pašalinimas. Virusai, kurie integruoja savo DNR į šeiminingo genomą ir pakeičia svarbius signalinius kelius, yra vadinami onkovirusais. Jie gali pakeisti ląstelės proliferacijos, diferenciacijos signalinius kelius, turėti įtakos genominiam stabilumui, apoptozei ar imuniniam atsakui, o šių procesų sutrikimai indukuoja vėžio vystymąsi (Suarez *et al.*, 2021). Autofagija taip pat pašalina genominių nestabilumą sukeliančius veiksnius, tokius kaip mikrobranduolius (Bartsch *et al.*, 2017), endogeninius retrotranspozonus (Frankel *et al.*, 2017) ir pažeistą DNR turinčius chromatinio fragmentus (Han *et al.*, 2020). Be to, autofagijos metu yra suskaidomos uždegimą skatinančios molekulės ir tai neleidžia vystytis lėtiniam uždegimui, kuris yra stiprus onkogenezę skatinantis veiksnys (Zhong *et al.*, 2016).

Nors autofagija slopina naviko vystymąsi sveikose ląstelėse, tačiau joms tapus vėžinėms, autofagija padeda prisitaikyti prie nepalankių sąlygų ir išgyventi (Chavez-Dominguez *et al.*, 2020, Towers *et al.*, 2020). Vėžinėse ląstelėse metabolizmas pakinta taip, kad greitai augančios ląstelės galėtų apsirūpinti ATP bei kitomis molekulėmis, kurios yra būtinos makromolekulių biosintezei (Lasche *et al.*, 2020). Metabolizmo pokyčiams svarbi autofagija,

nes jos substratai yra įvairūs, o degradacijos produktai gali būti panaudoti daugelyje metabolinių kelių. Pavyzdžiui, angliavandenių ir DNR skaidymas padidina glikolizės substratų kiekį, o baltymų ir lipidų – Krebso ciklo.

1.3 lentelė. Autofagijos reikšmė atsparumui.

Ląstelių linija	Atsparumas	Autofagija*	Slopinimas**	Šaltinis
Plaučių vėžys				
A549	Cisplatinai	↑	WO, CQ, 3-MA, ATG5↓, Beklinas-1↓	(W. Li <i>et al.</i> , 2020)
SPC-A1	Docetakseliui	-	ATG12↓	(Pan <i>et al.</i> , 2015)
NCI-H23	Paklitakseliui	↑	Beklinas-1↓	(W. Liu <i>et al.</i> , 2019)
Nosiaryklės vėžys				
CHE-1, HNE-1	Taksoliui	↑	3-MA, Beklinas-1↓	(Song <i>et al.</i> , 2017)
CHE-1, HNE-1	Cisplatinai, Nedplatinai	-	Bafilomicinas A	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
Osteosarkoma				
MG63, U2OS	Cisplatinai	↑	3-MA	(Jiang <i>et al.</i> , 2017)
MG63	Cisplatinai	↑	Beklinas-1↓	(Wu <i>et al.</i> , 2014)
Krūties vėžys				
MDA-MB-231, MDA-MB-468	Taksoliui	-	CQ	(R. X. Wang <i>et al.</i> , 2019)
MDA-MB-231, SUM159PT	Epirubicinui	↑	CQ, ATG5↓, ATG7↓	(Chittaranjan <i>et al.</i> , 2014)
MDA-MB-231	Paklitakseliui, Epirubicinui, Cisplatinai	↑	Spatinas-1, FIP200↓, ATG13↓	(Wen <i>et al.</i> , 2015)
MDA-MB-468, BT-549	5-FU, Doksorubicinui	↑	Bafilomicinas A, ATG5↓	(C. K. Das <i>et al.</i> , 2018)
Gimdos kaklelio vėžys				
HeLa	Paklitakseliui	↑	3-MA, ATG7↓	(Peng <i>et al.</i> , 2014)
Skrandžio vėžys				
SGC7901	Vinkristinui, 5-FU, Cisplatinai	↑	CQ, ATG12↓	(An <i>et al.</i> , 2015)
Glioblastoma				
U251, U87, LN229	Temozolomidui	-	CQ	(Golden <i>et al.</i> , 2014)
Kolorektalinis vėžys				
DLD1	5-FU	-	3-MA, ATG7↓	(Li <i>et al.</i> , 2010)
HCT8	5-FU	↑	CQ	(M. Wang <i>et al.</i> , 2018)
HCT116, SW480	OxaPt	↑	CQ	(H. Wang <i>et al.</i> , 2021)

*Autofagijos lygis atspariose ląstelėse lyginant su jautriomis.

** Autofagijos slopinimas, didinantis ląstelių jautrumą vaistams.

↑ – autofagijos aktyvinimas; ↓ – autofagijos baltymų kiekio mažinimas.

Inhibitoriai: WO – vortmaninas, CQ – chlorokvinas, 3-MA – 3-metiladeninas, bafilomicinas A; spautinas-1. Inhibitorių veikimo mechanizmai pateikti 1 pr. 1 pav.

Autofagija vėžinėms ląstelėms suteikia didžiulį metabolinį plastiškumą ir gebėjimą prisitaikyti prie energijos bei maisto trūkumo, hipoksijos ir kitų, su metabolizmu susijusių, neigiamų sąlygų (Chavez-Dominguez *et al.*, 2020, Kimmelman, White, 2017). Jei vėžinėse ląstelėse autofagija vyksta netinkamai, jose kaupiasi ROS ir pažeistos organelės, sulėtėja riebalų rūgščių oksidacija, glikolizė, pažeistos DNR skaidymas, sumažėja ATP ir nukleotidų kiekis (Guo *et al.*, 2016, Poillet-Perez *et al.*, 2019). Autofagijos įtaka vėžinėms ląstelėms skiriasi tarp skirtingų vėžio tipų. Vėžinėse ląstelėse, kuriose RAS-RAF-MEK-ERK signalinis kelias yra suaktyvėjęs, yra jautresnės autofagijos slopinimui (Bryant *et al.*, 2020, Kinsey *et al.*, 2019). Pavyzdžiui, įvairiose vėžinėse ląstelėse, tame tarpe ir HCT116, turinčiose mutavusį *KRAS* geną, bazinės autofagijos lygis yra padidėjęs, o autofagijos proceso slopinimas sukelia ląstelių žūtį ir slopina navikų augimą (Guo *et al.*, 2011).

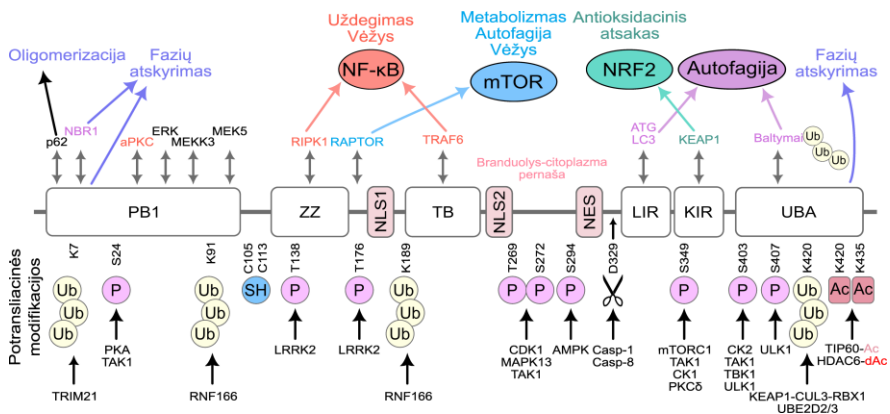
Autofagija yra susijusi ne tik su vėžinių ląstelių gebėjimu išgyventi, bet ir su atsparumu chemoterapiniams vaistams (Ho, Gorski, 2019). Yra žinoma, kad autofagija suintensyvėja vaistams atspariose vėžinėse ląstelėse, pavyzdžiui, plaučių (W. Li *et al.*, 2020), skrandžio (An *et al.*, 2015), kolorektalinio (H. Wang *et al.*, 2021) ir kt., o jos slopinimas padaro ląsteles jautresnes vaistų poveikiui (1.1 lentelė). Padidėjęs autofagijos aktyvumas yra susijęs su apoptozę skatinančių molekulių raiškos mažinimu (C. K. Das *et al.*, 2018, Jiang *et al.*, 2017), autofagijoje dalyvaujančių baltymų skaidymo proteasomose slopinimo (H. Wang *et al.*, 2021) arba autofagijos genų raiškos didinimo epigenetiškai (M. Wang *et al.*, 2018). Apibendrinti duomenys apie autofagijos svarbą įgytam atsparumui pateikti 1.3 lentelėje.

1.7. Selektivi autofagija ir p62 funkcijos

Priklausomai nuo krovinio patekimo į autofagosomą molekulinio mechanizmo autofagija gali būti skirstoma į neselektyvią arba selektyvią (Gatica *et al.*, 2018). Neselektyvios autofagijos metu citoplazmos komponentai, esantys šalia besiformuojančios autofagosomos, atsitiktinai patenka į jos vidų ir yra suskaidomi. Tokiu būdu yra palaikoma homeostazė. Vykstant selektyviai autofagijai kroviniai yra parenkami specifiškai, taip palaikant organelių kiekį ir kokybę bei apsaugant ląsteles nuo baltymų agregatų ar patogenų (Gubas, Dikic, 2022). Krovinais gali būti baltymų agregatai, peroksisomos, mitochondrijos, ET, lizosomos, branduolys, Goldžio kompleksas, proteasomos, ribosomos, lipidų lašeliai, viduląsteliniai patogenai ar makromolekulės (Beese *et al.*, 2019, Chang, Yang, 2022, Gatica *et al.*, 2018). Juos atpažįsta tam tikri baltymai – autofagijos receptoriai, kurie

specifiškai prisijungia prie krovinių ir jį nukreipia į autofagosomas. Autofagijos receptoriai pasižymi dviem pagrindinėmis savybėmis: krovinių atpažinimu ir gebėjimu prisijungti prie autofaginių membranų per ATG8 šeimos baltymus (LC3, GABARAP). Receptoriai prie LC3 jungiasi per su LC3 sąveikaujantį regioną (LIR), o prie GABARAP – su GABARAP sąveikaujančiu motyvu (GIM) (Kirkin, Rogov, 2019). Pagal krovinių atpažinimą receptoriai skirstomi į du tipus: prie ubikvitino prisijungiantys receptoriai (p62/SQSTM1, NBR1, CALCOCO2) ir organelių receptoriai (BNIP3, NIX/BNIP3L, FAM134B) (Gatica *et al.*, 2018).

Autofagijos receptorių p62, kuris dar vadinamas SQSTM1, atpažįsta ubikvitilintus krovinius: pažeistas mitochondrijas, agregavusius baltymus bei į ląsteles patekusias bakterijas (Sanchez-Martin *et al.*, 2019). Ląstelei patiriant stresą p62 koduojančio geno *SQSTM1* raiška yra indukuojama transkripcijos faktorių: esant oksidaciniam stresui – NRF2 (Vomund *et al.*, 2017), uždegimo atveju – NF-κB (Sultana *et al.*, 2021), o metabolinio streso metu – Mit/TFE (M. Yang *et al.*, 2018).



1.6 pav. Baltymo p62 domenai ir funkcijos. Schemoje pateiktos p62 potransliacinės modifikacijos ir jas įvedantys baltymai bei su p62 sąveikaujantys baltymai ir jų reguliuojami signaliniai keliai ar procesai. NLS1/2 – branduolio lokalizacijos seka, NES – išnešimo iš branduolio seka, K – lizinas, S – serinas, C – cisteinas, T – tirozinas, D – aspartatas, Ub – ubikvitilimas, P – fosforilimas, SH – disulfidinio tiltelio susidarymo vieta, (d)Ac – (de)acetilimas, Casp-1/8 – kaspazė-1/8. Parengta remiantis Hennig *et al.*, 2021.

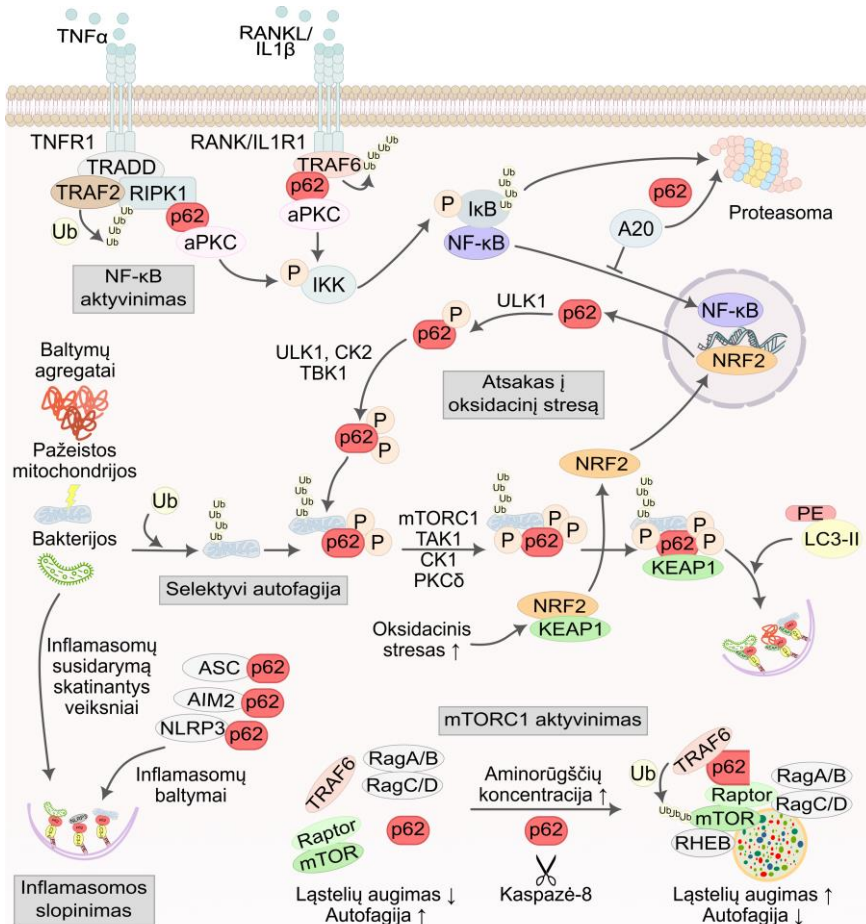
p62 yra susijęs ne tik su autofagija, bet ir su kitais procesais, tokiais kaip proliferacija, uždegimas, apoptozė ar diferenciacija, kuriuos reguliuoja mTOR, NF-κB ir NRF2 (Hennig *et al.*, 2021). p62 daugiafunkciškumą lemia įvairūs domenai: N-galo Phox1 ir Bem1p domenai (PB1), cinko pirštų motyvas (ZZ), TRAF6 prijungiantis motyvas (TB), su LC3 sąveikaujantis regionas (LIR), su Keap1 sąveikaujantis regionas (KIR) ir su ubikvitinu susijęs domenai (UBA). p62 taip pat turi dvi branduolio lokalizacijos sekas ir

vieną išnešimo iš branduolio seką (Hennig *et al.*, 2021, Sanchez-Martin *et al.*, 2019). Kadangi p62 yra susijęs ne tik su autofagija, bet ir kitais ląstelei gyvybiškai svarbiais procesais, jo aktyvumas yra griežtai valdomas (Hennig *et al.*, 2021). Tam yra svarbios potransliacinės modifikacijos: ubikvitilimas, fosforilimas, acetilimas, proteolitinis skėlimas ir disulfidinių tiltelių susidarymas (Berkamp *et al.*, 2021). p62 domenai, su jais sąveikaujantys baltymai, jų reguliuojami signaliniai keliai ar procesai bei potransliacinės modifikacijos ir jas įvedantys baltymai apibendrinti 1.6 pav.

Selektyvi autofagija. Baltymo N-gale esantis PB1 domenas yra svarbus p62 oligomerizacijai, kuri aktyvina jo prisijungimą prie ubikvitilintų taikinių bei fagoforo membranos (Wurzer *et al.*, 2015). Oligomerizaciją slopina PB1 domeną ubikvitilinti ubikvitino ligazė TRIM21 (Pan *et al.*, 2016) bei mažos nekoduojančios vRNR1-1 (angl. *vault RNAI-1*) prisijungimas prie ZZ domeno (Horos *et al.*, 2019). Esant oksidaciniam stresui p62 molekulėje tarp Cys105 ir Cys113 susidaro tarpmolekuliniai disulfidiniai tilteliai, kurie skatina p62 oligomerizaciją ir p62 dalyvavimą autofagijoje (Carroll *et al.*, 2018). p62 savo taikinius atpažįsta ir prie jų prisijungia per UBA domeną (Lee, Weihl, 2017). Toksiškų baltymų sukeltas stresas indukuoja Ser407 fosforilinimą, kuris lemia UBA domeno atidengimą ir ubikvitilintų baltymų prijungimą, o sekantis Ser407 fosforilinimas padidina prisijungimo prie ubikvitino afiniškumą. (Lim *et al.*, 2015, Sanchez-Martin *et al.*, 2019). UBA domeno Lys420 ir Lys435 acetilimas skatina nuo p62 priklausomą selektyvią autofagiją bei iš p62 ir ubikvitilintų baltymų sudarytų agregatų susidarymą (You *et al.*, 2019). Citoplazmoje p62 formuoja struktūras, vadinamas skysčio lašeliais, kurie leidžia su aplinka keistis komponentais. Toks fazių atskyrimas priklauso nuo PB1 ir UBA domenų (Berkamp *et al.*, 2021). Galiausiai p62 per LIR domeną jungiasi prie LC3-II, prisijungusio prie fagoforo membranos, ir kartu su kroviniu yra suskaidomas autolizosomose (Birgisdottir *et al.*, 2013).

Inflamasomų slopinimas. p62 yra svarbus ne tik selektyviai autofagijai, bet ir kitiems procesams (Hennig *et al.*, 2021). Vienas iš jų – inflamasomos susirinkimo reguliacija (Takahama *et al.*, 2018). Inflamasomos – tai uždegimą skatinantys citoplazminiai baltymų kompleksai. Jų susirinkimą indukuoja ląstelei pavojingi endogeniniai arba viduląstelių patogenų signalai DAMP/PAMP (su pažeidimais/patogenais susijusios molekulinės struktūros) (Broz, Dixit, 2016). Dėl pažeistų mitochondrijų ląstelėje padaugėja ROS ir oksiduotos mitochondrinės DNR, o tai skatina inflamasomų susirinkimą (Broz, Dixit, 2016). Pažeistos mitochondrijos yra ubikvitilinos, atpažįstamos p62 ir nukreipiamos degradacijai, taip slopinant inflamasomų susirinkimą ir uždegimą (Zhu, Liu, 2022). p62 taip pat tiesiogiai slopina

inflamasomas nukreipdamas jų struktūrinius baltymus (NLRP3, ASC, AIM2) autofaginiam skaidymui (Biasizzo, Kopitar-Jerala, 2020, Liu *et al.*, 2016).



1.7 pav. p62 baltymo funkcijos. p62 aktyvina NF-κB ir mTORC1 signalinius kelius, atsaką į oksidacinį stresą, dalyvauja selektyvioje autofagijoje bei slopina inflamasmų susirinkimą. Ub – ubikvitilinas, P – fosforilinas, PE – fosfatidiletanolaminas, ↑/↓ – proceso aktyvinimas/slopinimas, žirklės – p62 hidrolizė. Parengta pagal Sanchez-Martin *et al.*, 2019, Hennig *et al.*, 2021, Biasizzo, Kopitar-Jerala, 2020, Katsuragi *et al.*, 2015, Tao *et al.*, 2020, Kanayama *et al.*, 2015.

Atsako į oksidacinį stresą metu p62 nekanoniniu keliu aktyvina transkripcijos faktorių NRF2, kuris yra pernešamas į branduolį ir gali indukuoti kelių šimtų genų, tarp jų ir paties *SQSTM1*, transkripciją (Suzuki, Yamamoto, 2017, Vomund *et al.*, 2017). p62 sąveikaudamas su ubikvitilintu taikiniu yra fosforilinamas ties Ser349, o tai leidžia per KIR domeną prijungti pagrindinį NRF2 inhibitorių KEAP1 (Ichimura, Komatsu, 2018). Įprastai KEAP1 kartu su CUL3 ir RBX1 sudaro E3 ubikvitino ligazės kompleksą

(Keap-CUL3-RBX1), kuris nukreipia NRF2 į proteasomas suskaidymui (Suzuki, Yamamoto, 2017). Oksidacinio streso metu p62 konkuruoja su NRF2 dėl prisijungimo vietos ir suardo KEAP1-NRF2 sąveiką, tada laisvas NRF2 yra nunešamas į branduolį, kuriame jungiasi prie antioksidacinio atsako elemento (ARE) ir indukuoja genų raišką (Vomund *et al.*, 2017).

mTORC1 signalinio kelio aktyvinimas. Nors p62 yra autofagijos receptorius, tačiau jis taip pat gali aktyvinti autofagijos inhibitorių mTORC1 (Takahara *et al.*, 2020). Įprastai mTORC1 aktyvumas priklauso nuo viduląstelių ir užląstelių signalų: augimo faktorių, hormonų, ATP ar aminorūgščių kiekio ląstelėje (Condon, Sabatini, 2019). p62 sąveikauja su mTORC1 komplekso Raptor baltymu, kuris yra svarbus komplekso susidarymui, lokalizacijai ląstelėje, stabilumui ir sąveikai su kitais baltymais (Saxton, Sabatini, 2017). Esant didelei aminorūgščių koncentracijai MEKK3 kinazė jungiasi prie p62 PB1 domeno ir fosforilina Thr269 ir Ser272. Tada p62 sąveikauja su Rag baltymais, esančiais ant lizosomos membranos, ir pritraukia E3 ubikvitino ligazę TRAF6 ir mTORC1. TRAF6 ubikvitilina mTOR, o prie lizosomos membranos prisijungusi GTPazė RHEB aktyvina mTORC1. Tai lemia suintensyvėjusį anabolizmą ir ląstelių augimą (Katsuragi *et al.*, 2015, Takahara *et al.*, 2020). mTORC1 signalinį kelią gali aktyvinti p62 hidrolizė. RIPK1 aktyvintai kaspazei-8 hidrolizavus p62 ties Asp329 yra pašalinamas C-galas, kuriame yra LIR ir UBA domenai, reikalingi autofagijai vykti, tada p62 N-galas yra perkeliamas ant lizosomos membranos, pritraukia mTORC1 ir jį aktyvina (Martens, 2018, Sanchez-Garrido *et al.*, 2018).

NF-κB signalinio kelio aktyvinimas. p62 gali aktyvinti NF-κB signalinį kelią (Taniguchi, Karin, 2018). NF-κB – tai baltymų šeima, kuriai priklauso transkripcijos faktoriai, reguliuojantys imuninį atsaką, uždegimą, ląstelių proliferaciją ir žūtį (Liu *et al.*, 2017). Įprastai NF-κB signalinis kelias yra aktyvinamas IKK komplekso, kuris fosforilina NF-κB inhibitorių IκB ir nukreipia jį proteasominei degradacijai (Taniguchi, Karin, 2018). TNFα prisijungus prie TNFR1 ir jį aktyvinus, p62 per ZZ domeną prisijungia RIPK1 ir per PB1 domeną – atipinę baltymų kinazę C (aPKC) ir sudaro kompleksą, kuris aktyvina IKK kompleksą ir NF-κB signalinį kelią (Ha *et al.*, 2020). IL1β arba RANKL sąveikaujant su receptoriais yra pritraukiama E3 ubikvitino ligazė TRAF6. Tada TRAF6 vykdo autoubikvitilinimą, leidžiantį per TB domeną prisijungti p62, o prie jo jungiasi aPKC, kuri aktyvina IKK ir NF-κB signalinį kelią (Oh *et al.*, 2021, Tao *et al.*, 2020, Zotti *et al.*, 2014). Kitas būdas, kuriuo p62 aktyvina NF-κB – nukreipia jo inhibitorių A20 (TNFAIP3) autofaginiam skaidymui (Kanayama *et al.*, 2015). A20 pasižymi E3 ubikvitino ligazės ir deubikvitinazės aktyvumais. A20 deubikvitilina IKKγ ir neleidžia

susidaryti aktyviam IKK kompleksui, bei ubiquitilina RIPK1, dėl ko jis yra suskaidomas proteasomose (T. Das *et al.*, 2018)

DNR reparacijos reguliacija. p62 turi dvi įnešimo į branduolį sekas (NLS1/2) ir vieną išnešimo iš branduolio seką (NES) (Sanchez-Martin *et al.*, 2019). Branduolyje p62 nukreipia besikaupiančius baltymus į specifinius branduolio kūnelius, turinčius proteasomų subvienetus (Pankiv *et al.*, 2010). p62 taip pat yra svarbus DNR reparacijai. p62 palengvina DNR reparacinės sistemos baltymų, tokių kaip FLNA ir RAD51, skaidymą proteasomose (Hewitt *et al.*, 2016). Įvykus DNR pažeidimams yra indukuojamas prie jų esančių histonų poliubiquitilinimas, vykdomas E3 ubiquitino ligazės RNF168, kurią slopina p62 (Wang *et al.*, 2017).

Programuotos ląstelių žūties indukcija. Su išgyvenimo signalais dažniausiai siejamas p62 tam tikrais atvejais gali indukuoti ir ląstelių žūtį. Žūties receptorių DR4/5 indukuotai apoptozei vykti yra svarbus p62, dėl kurio vyksta žūties kompleksas, sudaryto iš E3 ubiquitino ligazės CUL-3 ir iniciacijos kaspazės-8, agregavimas ir apoptozės aktyvinimas (Jin *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2021). Tam tikromis sąlygomis p62 gali indukuoti kitą žūties tipą – programuotą nekrozę, dar vadinama nekroptoze. Sutrikus *MAP3K7* geno raiškai ir nevykstant autofagijai RIPK1 jungiasi prie p62 ir pritraukia RIPK3 bei MLKL baltymus ir sudaro nekrosomą. Tada nekrosoma persikelia ant autofagosomų membranų ir aktyvina nekroptozę (Goodall *et al.*, 2016, Yan *et al.*, 2020).

Procesai, kuriuose dalyvauja p62 ir jų reguliacija apibendrinti 1.7 pav.

1.8. Apoptozė ir nekroptožė

Ląstelių žūtis gali būti programuota arba neprogramuota. Neprogramuotai ląstelių žūčiai priskiriama nekrožė, o programuotai – apoptozė ir nekroptožė. Programuotos ląstelių žūtys dar gali būti lizinės ir nelizinės. Lizinėms ląstelių žūtims priklauso nekroptožė, kuri dar yra vadinama reguliuojama nekroze, o nelizinėms – apoptozė (Ketelut-Carneiro, Fitzgerald, 2022).

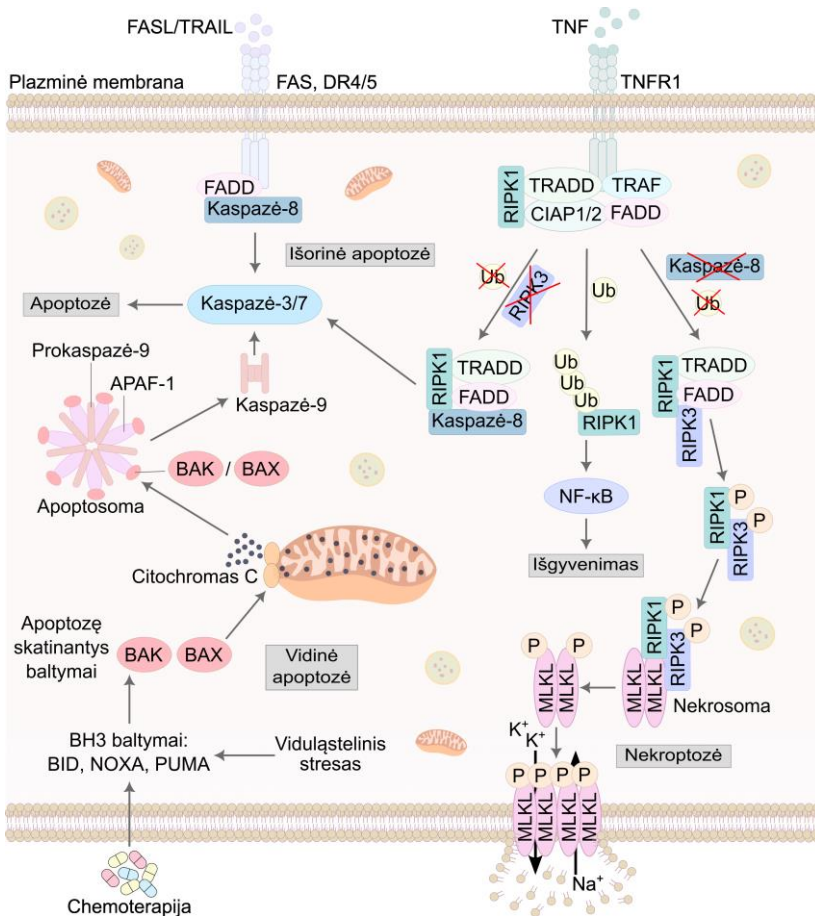
Nekroptožės metu ląstelės praranda membranos vientisumą bei potencialą, į ląstelę veržiasi vanduo ir ECM esantys jonai, ląstelės brinksta kol galiausiai plyšta ir į užpildą išteka uždegimą skatinantys veiksniai. Apoptozės metu ląstelės plazminė membrana pūslėja, ląstelė didėja, branduolys fragmentuojasi, chromatinas kondensuojasi, ant ląstelės išorės yra eksponuojamas fosfatidilserinas, reiškiantis signalą „suvalgyk mane“, ir galiausiai susiformuoja apoptoziniai kūneliai (J. Chen *et al.*, 2019).

Apoptozė gali būti aktyvinama vidinių, nuo mitochondrijų priklausomų, arba išorinių, nuo žūties receptorių priklausomų, signalinių kelių (Cavalcante

et al., 2019). Vidinę apoptozę indukuoja viduląsteliniai streso veiksniai, tokie kaip, maisto ir augimo faktorių trūkumas, DNR pažaidos, ET stresas bei chemoterapija. Šiuo atveju yra aktyvinami tik BH3 domeną turintys baltymai (BID, NOXA, PUMA), kurie reguliuoja apoptozę (BAX, BAK) ir išgyvenimą (BCL-2) skatinančių baltymų veiklą. Aktyvius vidinę apoptozę įvyksta mitochondrijų išorinės membranos permeabilizacija ir iš tarpmembraninės erdvės į citoplazmą išsilieja citochromas c. Citochromas c jungiasi prie APAF-1 ir inicijuoja jo oligomerizaciją, o heptamerinis APAF-1 kompleksas sąveikauja su prokaspazė-9 ir suformuoja apoptosomos kompleksą. Susidarius apoptosomai prokaspazė-9 yra aktyvinama, o aktyvi inicijuojančioji kaspazė-9 hidrolizuoja ir aktyvina vykdančiąsias kaspazes-3 ir 7, galiausiai yra inicijuojama apoptozė (Cavalcante *et al.*, 2019, Ketelut-Carneiro, Fitzgerald, 2022). Išorinę apoptozę aktyvina ląstelės plazminėje membranoje esantys žūties receptoriai, prie kurių jungiasi ECM esančios signalinės molekulės – žūties ligandai. Žūties ligandai FASL, TNF, TRAIL, jungiasi prie specifinių receptorių, atitinkamai, FAS, TNFR1/2, DR4/DR5, ir iš citozolinės ląstelės pusės pritraukia adaptorines molekules FADD ir TRADD (Schwabe, Luedde, 2018). Šios molekulės sudaro kompleksą per homotipinę žūties domenų sąveiką, pritraukia prokaspazę-8 ir ją aktyvina. Aktyvi kaspazė-8 hidrolizuoja prokaspazes-3 bei 7, kurios sukelia apoptozę (Ketelut-Carneiro, Fitzgerald, 2022). Net ir esant žūties ligandams ląstelės gali išvengti žūties. FAS aktyvina žūtį įvairių tipų ląstelėse, o TNF-TNFR1/2 signalinis kelias gali aktyvinti išgyvenimą, apoptozę ar nekrotozę. TNF atveju ląstelės žūsta jei yra slopinami antiapoptoziniai signalai, kuriuos dažniausiai indukuoja NF-κB (J. Chen *et al.*, 2019, Schwabe, Luedde, 2018). Apoptozės reguliacija apibendrinta 1.8 pav.

Nekrotozė yra indukuojama TNF molekulei prisijungus prie receptoriaus TNFR1 ir citozolyje susidarant I tipo kompleksui. Kompleksą sudaro TRADD, FADD, RIPK1, TRAF ir CIAP1/2. TRAF plazminėje membranoje ubikvitilina ir stabilizuoja RIPK1, FADD pritraukia prokaspazę-8, RIPK1 mobilizuoja RIPK3. Susidarius I tipo kompleksui ląstelės gali išvengti žūties, žūti apoptozės arba nekrotozės būdu. Jei RIPK1 yra ubikvitilinimas tarpininkaujant cIAP ir TRAF2/5, žūtis yra sustabdoma. Jeigu RIPK1 neubikvitilinamas, o RIPK3 aplinkoje nėra arba jo kiekis yra mažas, tada RIPK1 atsiskiria nuo I komplekso ir sudaro II kompleksą, kuris yra sudarytas iš FADD, TRADD bei kaspazės-8 ir yra indukuojama apoptozė. Tačiau ląstelėje esant pakankamam RIPK3 kiekiui, o kaspazė-8 yra slopinama, RIPK1 ir RIPK3 suformuoja kompleksą, kuris yra vadinamas nekrosoma, ir yra indukuojama nekrotozė. Susidarius nekrosomai RIPK3 yra aktyvinamas autofosforilinas, o fosforilintas RIPK3 pritraukia ir fosforilina MLKL,

sukeldamas jo oligomerizaciją ir aktyvinimą. pMLKL kompleksas yra perkeliamas prie viduląstelių ir plazminės membranų, pažeidžia jų vientisumą ir sukelia nekroptozę (Ketelut-Carneiro, Fitzgerald, 2022). Nekroptozės reguliacija pavaizduota 1.8 pav.



1.8 pav. Apoptozės ir nekroptozės reguliacija. Ub – ubiquitilinimas; P – fosforilinimas. Parengta remiantis Shalini *et al.* 2015, Ketelut-Carneiro, Fitzgerald, 2022.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos ir tirpalai

Ląstelių kultivavimui:

EDTA (E6511, *Sigma-Aldrich*) ruošiamas PBS, galutinė koncentracija 0,985 mM, sterilinamas autoklavuojant;

Tripsinas (T4799, *Sigma-Aldrich*) ruošiamas EDTA tirpale, galutinė koncentracija 0,5 mg/mL, sterilinamas filtruojant per 0,22 µm dydžio poras turinčius filtrus (SVGPB1010, *Merck*);

RPMI 1640 (61870036, *Thermo Fisher Scientific*) – ląstelių auginimo terpė (toliau terpė), skirta HCT116 ląstelių ir jų sublinijų kultivavimui;

DMEM (11960044, *Thermo Fisher Scientific*) – terpė, skirta SW620 ląstelių ir jų sublinijų kultivavimui;

Negimusio veršelio serumas (FBS, angl. *fetal bovine serum*) (A0500-3230, *Cegrogen biotech*) naudojamas ląstelių kultivavimui;

„*GlutaMAX*™“ (35050061, *Thermo Fisher Scientific*) – stabilus glutaminas, naudojamas ląstelių kultivavimui;

Penicilino ir streptomicino tirpalas (15070063, *Thermo Fisher Scientific*) naudojamas ląstelių kultivavimui.

Chemoterapiniai vaistai ir inhibitoriai:

5-fluoruracilas (5-FU) (*Accord Healthcare*) – pradinė koncentracija 50 mg/mL. Eksperimentams skiedžiamas ddH₂O;

Oksaliplatina (OxaPt) (*Accord Healthcare*) – pradinė koncentracija 5 mg/mL. Eksperimentams skiedžiamas ddH₂O;

Chlorokvinas (CQ) (C6628, *Sigma-Aldrich*) – autofagijos inhibitorius, sutrikdantis skaidymą lizosomose. Ruošiamas ddH₂O (10 mg/mL), sterilinamas filtruojant. Eksperimentams naudojama koncentracija – 30 µM.

Imunoblotingas:

Glicerolis (505350501, *Lachema*) naudojamas mėginių ruošimui;

Bromfenolio mëlis (227358, *Sigma-Aldrich*) – mėginių ruošimui;

DTT (6908, *Roth*) – mėginių ruošimui;

Tris (5429, *Roth*) – mėginių ruošimui, SDS-PAGE, elektroforezės, pernešimo ir TBS/T tirpalų gamybai;

SDS (2326, *Roth*) – mėginių ruošimui, SDS-PAGE ir elektroforezės tirpalų gamybai;

„*Rotiphorese*® Gel 40 (37.5:1)“ (T802, *Roth*) – akrilamido ir bisakrilamido tirpalas, naudojamas SDS-PAGE gamybai;

TEMED (T9281, *Sigma-Aldrich*) – SDS-PAGE gamybai;
APS (A3678, *Sigma-Aldrich*) – SDS-PAGE gamybai;
Glicinas (T873, *Roth*) – elektroforezės ir pernešimo tirpalų gamybai;
Izopropanolis (9866, *Roth*) – pernešimo tirpalo gamybai ir MTT metodui;
„Tween20[®]“ (9127, *Roth*) – TBS/T tirpalo gamybai;
Vandenilio chloridas (07102, *Honeywell*) – Tris tirpalų pH mažinimui;
4 × baltymų užnešimo dažas: 40 % glicerolio, 8 % SDS, 0,04 % bromfenolio mėlio, 0,4 M DTT ir 250,4 mM Tris-HCl, pH 6,8;
Elektroforezės tirpalas: 24,76 mM Tris, 191,8 mM glicino, 3,47 mM SDS;
Pusiau sauso pernešimo tirpalas: 48 mM Tris, 39 mM glicino, 1,3 mM SDS, 15 % izopropanolio;
TBS/T tirpalas: 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween20;
Antikūnų pašalinimo nuo membranos tirpalas: 10 mL 10 % SDS, 3 mL 1 M Tris (pH 7,4), 0,39 mL 100 nM β-merkaptoetanolio.

Kitos medžiagos ir tirpalai:

Fosfatų buferinis druskų tirpalas (PBS) ruošiamas ddH₂O ir sterilinamas autoklavuojant. Sudėtis: 171,1 mM NaCl (3957, *Roth*), 3,35 mM KCl (P9541, *Sigma-Aldrich*), 1,84 mM KH₂PO₄ (P5379, *Sigma-Aldrich*) ir 10,14 mM Na₂HPO₄ (P030, *Roth*) (pH 7,3);

„Dulbecco“ fosfatų buferinis druskų tirpalas (DPBS) ruošiamas ddH₂O ir sterilinamas autoklavuojant. Sudėtis: 136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,12 mM Na₂HPO₄, 0,9 mM CaCl₂ (C7902, *Sigma-Aldrich*) ir 0,83 mM MgSO₄ (M2643, *Sigma-Aldrich*) (pH 7,3);

„IGEPAL[®] CA-630“ (I7771, *Sigma-Aldrich*) – NP-40 analogas, skirtas REAP metodui.

2.2. Ląstelių linijos ir kultivavimas

HCT116 (CCL-247, *ATCC*) – žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelių linija, išvesta iš pirminio naviko. Šios ląstelės pasižymi MSI, turi mutacijas, įvykusias *KRAS* ir *PIK3CA* genuose (Ahmed *et al.*, 2013).

HCT116/FU – sublinija, išvesta iš HCT116 ląstelių, jas kultivuojant su 5-FU, koncentraciją didinant nuo 10 μM iki 20 μM. Ląstelės kultivuotos metus, kol įgijo stabilų atsparumą 5-FU, kuris siekia dešimt kartų. Šios ląstelės yra du kartus atsparesnės OxaPt poveikiui.

HCT116/OXA – sublinija, išvesta iš HCT116 ląstelių, jas kultivuojant su OxaPt, koncentraciją didinant nuo 1 μM iki 20 μM. Ląstelės kultivuotos devynis mėnesius, kol įgijo stabilų atsparumą OxaPt, kuris siekia dešimt kartų. Šios ląstelės tapo dešimt kartų atsparesnės ir 5-FU poveikiui.

SW620 (CCL-227, ATCC) – žmogaus kolorektalinės adenokarcinomos ląstelių linija, išvesta iš į limfmazgius metastazavusių ląstelių. Turi mutacijas, įvykusias *KRAS* ir *TP53* genuose (Ahmed *et al.*, 2013).

SW620/FU – sublinija, išvesta iš SW620 ląstelių, jas kultivuojant su 5-FU, koncentraciją didinant nuo 5 μM iki 50 μM . Ląstelės kultivuotos metus, kol įgijo stabilų atsparumą 5-FU, kuris siekia tris kartus. Šios ląstelės yra du kartus atsparesnės OxaPt poveikiui.

SW620/OXA – sublinija, išvesta iš SW620 ląstelių, jas kultivuojant su OxaPt, koncentraciją didinant nuo 5 μM iki 50 μM . Ląstelės kultivuotos metus, kol įgijo stabilų atsparumą OxaPt, kuris siekia du kartus.

Ląstelės kultivuojamos lėkštutėse, kurių augimo paviršiaus plotas yra 21,5 cm² arba 9,4 cm² (*Thermo Fisher Scientific*) (2.1 lentelė). Terpė papildoma 10 % FBS, penicilino/streptomicino tirpalu ir, jei reikia, „GlutaMAX[®]“ tirpalu. Ląstelės kultivuojamos 37 °C su 5 % CO₂ ir 95 % drėgmės aplinkoje. Persėjamos du-tris kartus per savaitę. Persėjimo metu nuo ląstelių nusiurbiamą terpę, ląstelės plaunamos EDTA tirpalu. Toliau ant ląstelių užpilamas tripsino tirpalas, kuris iš karto nusiurbiamas. Po to HCT116 ląstelės ir jų sublinijos inkubuojamos 2 min. kambario temperatūroje, o SW620 ląstelės ir jų sublinijos – 2 min. 37 °C termostate. Ląstelės atkeliamos šviežia terpe ir perkeliamos į kultivavimo indus skiedžiant nuo 5 iki 10 kartų, priklausomai nuo augimo greičio ir ląstelių skaičiaus. Ląstelės kultivuojamos iki 20 pasažo.

2.1 lentelė. Ląstelių kultivavimui ir eksperimentams naudoti indai ir terpės tūriai.

Ląstelių kultivavimo indas*	Tūris, mL	Panaudojimas
21,5 cm ² lėkštutės (12556001)	4,4	Ląst. kultivavimas, REAP
9,4 cm ² lėkštutės (12556000)	1,85	Ląst. kultivavimas
6 šulinėlių plokštelės (12556004)	1,85	WB, ELISA
12 šulinėlių plokštelės (12556005)	0,72	kPGR, WB, ELISA, FC, KV
24 šulinėlių plokštelės (12556006)	0,38	KV
48 šulinėlių plokštelės (12556007)	0,18	KV, MTT

*Pirkta iš *Thermo Fisher Scientific*

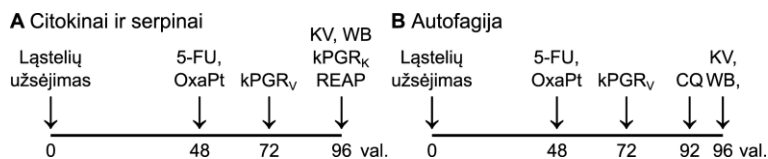
2.3. Eksperimentų atlikimo eiga

Eksperimentams naudojamos įvairaus dydžio lėkštutės arba plokštelės, kurios kartu su terpės tūriais ir panaudojimu eksperimentams nurodytos 2.1 lentelėje. Ląstelės dėl nevienodo augimo greičio sėjamos skirtingais tankiais, kad po 48 val., kai jos veikiamos vaistais, tankis būtų apie 1×10^5 ląstelių/cm² (Kukcinavičiūtė, 2019). Sėjimo tankiai nurodyti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Ląstelių sėjimo tankiai.

Ląstelių linija	Ląstelės/mL	Ląstelių linija	Ląstelės/mL
HCT116	1×10^5	SW620	$1,5 \times 10^5$
HCT116/FU	2×10^5	SW620/FU	$1,5 \times 10^5$
HCT116/OXA	$1,5 \times 10^5$	SW620/OXA	2×10^5

Praėjus 48 val. nuo ląstelių užsėjimo į terpę įdedami 5-FU ir OxaPt. Vaistų įtaka transkriptų kiekiui (kPGR_V) vertinama praėjus 24 val., o baltymų (WB) kiekiui – 48 val. nuo vaistų poveikio. Šiame laiko taške vertinamas ir ląstelių gyvybingumas ląsteles dažant kristaliniu violetiniu (KV). Autofagijos srauto vertinimui chlorokvinas (CQ) į terpę įdedamas likus 4 val. iki ląstelių surinkimo. Citokinų ir serpinų transkriptų pokyčiai atspariose sublinijose vertinami praėjus 92 val. nuo ląstelių užsėjimo (kPGR_K). Serpino B5 lokalizacijai nustatyti ląstelės išfrakcionuojamos praėjus 92 val. nuo užsėjimo (REAP). Eksperimentų schema pateikta 2.1 pav.



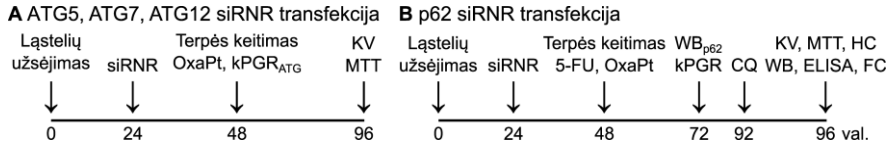
2.1 pav. 5-FU ir OxaPt poveikio vertinimo eksperimentų schemas. Eksperimentų schema tiriant vaistų įtaką citokinų ir serpinų raiškai (A) ir autofagijos molekulių raiškai (B).

2.4. Transfekcijos siRNR eksperimentų eiga

Transfekcijos eksperimentams naudojamos HCT116 ląstelės ir jų atsparios sublinijos. Ląstelės sėjamos terpėje be antibiotikų. HCT116 ląstelės sėjamos 1×10^5 ląstelių/mL, o HCT116/FU ir HCT116/OXA – $1,5 \times 10^5$ ląstelių/mL. HCT116/FU ląstelės sėjamos mažesniu tankiu, lemiančiu efektyvesnę transfekciją. Transfekcija vykdoma praėjus 24 val. nuo užsėjimo. Dar po 24 val. yra keičiama terpė į šviežią terpę su visais priedais bei įdedami 5-FU ir OxaPt. ATG5, ATG7 ir ATG12 tildymo efektyvumas nustatomas praėjus 24 val. nuo transfekcijos transkriptų lygiu (kPGR_{ATG}), o p62 – baltymo lygiu praėjus 48 val. nuo transfekcijos (WB_{p62}).

Pasirinkto taikinio kiekio mažinimo reikšmė ląstelių gyvybingumui vertinama praėjus 72 val. nuo transfekcijos KV metodu, matuojant mitochondrijų oksidoreduktazių aktyvumą (MTT) arba ląsteles skaičiuojant hemacitometru (HC). p62 raiškos tildymo įtaka citokinus koduojančių transkriptų kiekiui (kPGR) vertinama praėjus 48 val. nuo transfekcijos, o žūtyje dalyvaujančių baltymų, CXCR2 kiekiui, autofagijos srautui (WB), ląstelių žūčiai (FC) bei IL8 sekrecijai (ELISA) – 72 val. nuo transfekcijos.

Autofagijos srautui nustatyti ląstelės prieš surinkimą 4 val. inkubuojamos autofagijos inhibitoriumi chlorokvinu (CQ). Transfekcijos eksperimentų schema pateikta 2.2 pav.



2.2 pav. Transfekcijos eksperimentų schema tiriant ATG5, ATG7, ATG12 (A) ir p62 (B) raiškos tildymo reikšmę gyvybingumui ir išgyvenimui svarbių molekulių kiekiui.

2.5. Ląstelių transfekcija siRNR

Transfekcija vykdoma įvairaus dydžio plokštelėse, priklausomai nuo eksperimento (2.1 lentelė). Reagentų tūriai pagal kultivavimo indus pateikti 2.3 lentelėje. siRNR ir transfekcijos reagentas „*Lipofectamine RNAiMAX*™“ (13778075, *Thermo Fisher Scientific*) švelniai sumaišomi su „*Opti-MEM*™“ terpe (31985062, *Thermo Fisher Scientific*) ir inkubuojami kambario temperatūroje 20 min. Po inkubacijos susidarę kompleksai švelniai sulašinami ant ląstelių.

2.3 lentelė. Transfekcijos sąlygos vienam šulinėliui.

Reagentas (μL)	Šulinėlių skaičius plokštelėje			
	48	24	12	6
<i>Opti-MEM</i> ™ terpė	40	100	100	200
siRNR (10 μM)	0,134	0,29	0,5	1,25
<i>Lipofectamine RNAiMAX</i> ™	0,4	1,76	3	7,5
	20 min. inkubacija			
Terpės tūris šulinėlyje	180	380	720	1850
Terpės + transfekcijos mišinio tūris	220	480	820	2050
Galutinė siRNR koncentracija šulinėlyje	6 nM			

Transfekcijos eksperimentams naudojamos specifinės siRNR, kurių taikiniai yra ATG5, ATG7, ATG12 ir p62 (*SQSTM1*) baltymus koduojantys transkriptai (2.4 lentelė). Neigiamai kontrolei (NK) naudojamas žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys „*AllStars*“ (1027280, *Qiagen*).

2.4 lentelė. Specifinių siRNR sekos.

siRNR taikinytis	Seka (5'→3')	Gamintojas, Kat. Nr.
<i>ATG5</i>	CAUCUGAGCUACCCGGAUAtt	4390827, <i>Ambion</i>
<i>ATG7</i>	CCAACACACUCGAGUCUUUtt	4390827, <i>Ambion</i>
<i>ATG12</i>	GCAGUAGAGCGAACACGAAtt	4457298, <i>Ambion</i>
<i>SQSTM1</i>	TCGGAGGATCCGAGTGTGAAT	SI03116750, <i>Qiagen</i>

2.6. Kiekybinė PGR

Nuo ląstelių nusiurbiamo terpė ir jos kartą praplaunamos EDTA tirpalu. Ląstelės nuo kultivavimo indo atkeliamos tripsinu, kuris neutralizuojamas terpe su visais jos priedais. Ląstelių suspensija centrifuguojama $1\ 000 \times g$ 7 min. $4\ ^\circ\text{C}$. Supernatantas nusiurbiamas, o ląstelės kartą plaunamos PBS jas centrifuguojant $1\ 000 \times g$ 7 min. $4\ ^\circ\text{C}$. Mėgintuvėliai su ląstelėmis visą rinkimo laiką laikomi leduose.

RNR išskiriama naudojant rinkinį „GeneJET RNA Purification Kit“ (K0731, *Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas. RNR koncentracija ir grynumas vertinamas „NanoDrop 2000“ spektrofotometru (*Thermo Fisher Scientific*). Išskirta RNR laikoma $-70\ ^\circ\text{C}$.

Komplementari DNR (kDNR) sintetinama iš 1-3 μg RNR naudojant „MaximaTM H Minus cDNA Synthesis Master Mix“ rinkinį (M1661, *Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas. Reakcija atliekama termocikleryje „Eppendorf Mastercycler“ (*Sigma-Aldrich*). kDNR skiedžiama vandeniu be nukleazių iki 10 ng/ μL .

Kiekybinė PGR (kPGR) atliekama 96 šulinėlių PGR plokštelėse (4346907, *Applied Biosystems*) arba 8 šulinėlių strypeliuose (strypeliai – 4358293, dangteliai – 4323032, *Applied Biosystems*). Reakcijos mišinį sudaro:

- 5 μL kDNR (50 ng);
- 10 μL „Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)“ (K0221, *Thermo Fisher Scientific*);
- 5 μL Tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinys (0,3 μM).

Reakcija vykdoma termocikleryje „StepOnePlusTM Real-Time PCR System“ (*Applied Biosystems*). Tiriamųjų genų raiška normalizuojama pagal atskaitos genų *HPRT* ir/ar *TBP* raišką. Norint išvengti genominės DNR amplifikacijos pradmenys parenkami ant transkripto egzono-egzono ribos. Pradmenys įsigyti iš „Metabion“, o jų sąrašas pateiktas 2 pr. 1 lentelėje. Transkriptų raiškos pokyčiai vertinami $\Delta\Delta C_t$ metodu. Santykinis raiškos pokytis lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$2^{-((C_t(\text{tiriamo geno}) - C_t(\text{atskaitos geno}))_{\text{poveikis}} - (C_t(\text{tiriamo geno}) - C_t(\text{atskaitos geno}))_{\text{kontrolė}})}$$

C_t – ciklo numeris, kai amplifikacijos kreivė kerta slenkstinę vertę, t. y. reakcijos metu registruojama fluorescencija viršija foninę fluorescenciją. Rezultatai pateikiami kaip santykiniai transkriptų kiekio pokyčiai (kartais), pagal atskaitos genų raišką lyginant kontrolines ląsteles (vaistais neveiktos

arba NK ląstelės) su ląstelėmis po poveikio (vaistais arba specifinėmis siRNR veiktos ląstelės). Biologiškai reikšmingu pokyčiu yra laikoma, kai tiriamo transkripto kiekis pasikeičia bent du kartus lyginant su kontrole.

2.7. Imunoblotingas

2.7.1. Mėginių paruošimas

Terpė nuo ląstelių surenkama į mėgintuvėlius, kurie yra laikomi leduose. Ląstelės kartą plaunamos EDTA tirpalu, kuris taip pat surenkamas į mėgintuvėlius. Ląstelės atkeliamos tripsinu, kuris neutralizuojamas terpe su visais priedais. Atkilusios ląstelės yra perkeliamos į mėgintuvėlius. Surinkta ląstelių suspensija centrifuguojama $1\ 000 \times g$ 7 min. $4\ ^\circ C$. Supernatantas nusiurbiamas, ląstelės kartą plaunamos lediniu PBS. Po to ląstelės dar kartą centrifuguojamos $1\ 000 \times g$ 7 min. $4\ ^\circ C$. Po centrifugavimo supernatantas pašalinamas. Ląstelės lizuojamos „RIPA“ tirpalu (89901, *Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojos rekomendacijas. „RIPA“ tirpalas papildomas proteazių (P2714, *Sigma-Aldrich*) ir, jei analizuojami fosforilinti baltymai, fosfatazių (P0044, *Sigma-Aldrich*) inhibitoriais. Ląstelių lizatai centrifuguojami $14\ 000 \times g$ 15 min. $4\ ^\circ C$. Supernatantai perkeliama į naujus mėgintuvėlius ir laikomi $-70\ ^\circ C$.

2.7.2. Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracija nustatoma naudojant „Pierce™ BCA Protein Assay“ rinkinį (23225, *Thermo Fisher Scientific*) pagal gamintojo rekomendacijas. Matavimai atliekami 96 šulinėlių plokštelėse su $2\ \mu L$ ląstelių lizato ir $198\ \mu L$ rinkinio tirpalų mišinio. Mėginių sugertis (A_{562}) matuojama spektrofotometru „Multiskan GO“ (*Thermo Fisher Scientific*).

2.7.3. Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Ląstelių lizatas, turintis $50\ \mu g$ baltymų, yra skiedžiamas PBS iki $37,5\ \mu L$ ir sumaišomas su $12,5\ \mu L$ $4 \times$ baltymų užnešimo dažų. Mėginiai sumaišomi, nucentrifuguojami ir inkubuojami 5 min. $95\ ^\circ C$ maišant termopurtyklėje „Thermomixer Comfort“ (*Eppendorf*).

SDS-poliakrilamidinis gelis (SDS-PAGE) ruošiamas ant 10 % arba 12 % skiriamąjo gelio užpolimerinus 4 % koncentruojamąjį gelį. Ant skiriamąjo gelio polimerinimosi metu užpilama izopropanolio, kuris po to nuplaunamas vandeniui. Abu sluoksniai polimerinami po 45 min. 10 % gelis naudojamas ATG7, ATG12, RIPK1, pRIPK3, CXCR2 ir SB5 išfrakcionavimui, o 12 % –

p62, LC3B, kaspazės-3, BAX ir BCL2. Informacija apie gelių sudėtį pateikta 2.5 lentelėje.

Elektroforezei naudojamas aparatas „Vertical electrophoresis unit, adjustable height, dual gel“ (Sigma-Aldrich), pripildytas elektroforezės tirpalu. Baltymų dydžiai nustatomi naudojant „Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (26623, Thermo Fisher Scientific). Baltymai koncentruojami 1 val. esant 80 V įtampai ir frakcionuojami 3 val. esant 120 V įtampai. Baltymų pusiau sausas pernešimas

2.5 lentelė. SDS-PAGE sudėtis.

Medžiaga	4 %	10 %	12 %
Vanduo (mL)	3,21	7,5	6,75
Tris-HCl su 0,4% SDS (mL)	1,25*	3,75**	3,75**
ROTIPHORESE Gel 40 (mL)***	0,49	3,75	4,5
TEMED (μL)	5	10	10
APS (10 %) (μL)	25	50	50
Bendras tūris (mL)	4,98	15,06	15,06

* 0,5 M Tris-HCl su 0,4 % SDS, pH 6,8

** 1,5 M Tris-HCl su 0,4 % SDS, pH 8,8

*** Imamas vienkartinė pipetė

Išfrakcionuoti baltymai iš gelio pernešami ant 0,45 μm nitroceliuliozinės membranos (88018, Thermo Fisher Scientific). Pernešimas vyksta pusiau sauso pernešimo aparatu „V20-SDB“ (Biotech). Aparato anodinė dalis sudrėkinama pernešimo tirpalu ir ant jos dedami tuo pačiu tirpalu sudrėkinti 4 „Whatman 3MM“ chromatografiniai lapeliai (30306461, Thermo Fisher Scientific), nitroceliuliozinė membrana (88018, Thermo Fisher Scientific), gelis ir dar 4 chromatografiniai lapeliai. Uždėjus kiekvieną sluoksnį voleliu išstumiami susidarę burbulai. Uždedamas sudrėkintas katodinis dangtis. Baltymai pernešami 1 val. esant 1 mA/cm² srovei.

2.7.4. Baltymų vaizdinimas

Po baltymų pernešimo membrana plaunama TBS/T tirpalu ir blokuojami 1 val. jaučio serumo albumino (BSA) tirpale (37525, Thermo Fisher Scientific), kuris skiedžiamas TBS/T tirpalu. Po blokavimo membrana plaunama TBS/T tirpalu ir supjaustoma juostelėmis, turinčiomis po vieną tiriamąjį baltymą. Membranos inkubuojamos per naktį 4 °C su TBS/T tirpale skiestais pirminiais antikūnais (2.6 lentelė). Po inkubacijos membranos plaunamos TBS/T tirpalu: vieną kartą 15 min. ir du kartus po 5 min. maišant purtyklėje. Po to membranos inkubuojamos 2 val. kambario temperatūroje su krienų peroksidaze konjuguotais antriniais antikūnais, nukreiptais prieš triušio

IgG (31460, *Thermo Fisher Scientific*) arba prieš pelės IgG (31430 *Thermo Fisher Scientific*). Antikūnai skiedžiami 5 000 kartų TBS/T tirpalu. Po inkubacijos membranos plaunamos TBS/T tirpalu. Prieš baltymų vaizdinimą membranos išdžiovinamos.

2.6 lentelė. WB analizei naudoti pirminiai antikūnai.

Taikinys	Dydis, kDa	Skiedimas	Gyvūnas	Kat. Nr., gamintojas
α -tubulinas	52	5 000	Triušis	ab52866, <i>Abcam</i>
β -aktinas	42	5 000	Triušis	ab8227, <i>Abcam</i>
ATG7	75	1 000	Pelė	MAB6608, <i>R&D Systems</i>
ATG12	17	1 000	Triušis	701684, <i>Invitrogen</i>
BAX	23	500	Pelė	sc-7480, <i>Santa Cruz</i>
BCL2	28	500	Triušis	sc-492, <i>Santa Cruz</i>
CXCR2	45	1 000	Triušis	PA5-111765, <i>Invitrogen</i>
Kaspazė-3 _{kirpta}	17-19	1 500	Triušis	9661, <i>Cell Signaling</i>
LC3B	16-18	5 000	Triušis	ab51520, <i>Abcam</i>
p62	62	10 000	Triušis	ab109012, <i>Abcam</i>
RIPK1	78	1 000	Pelė	MAB3585, <i>R&D Systems</i>
pRIPK3 _(S227)	54	3 000	Triušis	ab209384, <i>Abcam</i>
Serpinas B5	42	1 000	Triušis	PA5-79979, <i>Invitrogen</i>

Membranos inkubuojamos nuo 10 sek. iki 1 min. (priklausomai nuo baltymo švytėjimo intensyvumo) „Pierce™ ECL Western Blotting Substrate“ (32106, *Thermo Fisher Scientific*) reagentuose. Toliau membranos eksponuojamos nuo 5 sek. iki 5 min. ant fotojuostos (7711468, *Carestream*). Fotojuostos laikomos ryškinimo tirpale (5274394, *Carestream*), plaunamos vandeniui ir fiksuojamos fiksavimo tirpale (5224381, *Carestream*). Fotojuostos nuplaunamos vandeniui.

Baltymų kiekis vertinamas „Fiji“ programine įranga (Schindelin *et al.*, 2012). Santykinis baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

$$\text{Santykinis baltymo kiekis} = \frac{\left(\frac{x \text{ baltymo juostelės tankis}}{\text{aktino/tubulino juostelės tankis}} \right)_{\text{Poveikis}}}{\left(\frac{x \text{ baltymo juostelės tankis}}{\text{aktino/tubulino juostelės tankis}} \right)_{\text{Kontrolė}}}$$

2.7.5. Antikūnų pašalinimas nuo membranos

Prieš antikūnų pašalinimą membranos nuplaunamos ddH₂O ir 45 min. inkubuojamos antikūnų pašalinimo tirpale 50 °C hibridizacijos krosnyje. Po inkubacijos membrana plaunama du kartus po 10 min. TBS/T tirpalu. Toliau membrana ruošiama kaip aprašyta 2.7.5. skyriuje.

2.8. Tėkmės citometrija

Terpė nuo ląstelių surenkama į mėgintuvėlius (mėgintuvėliai laikomi leduose). Ląstelės kartą plaunamos EDTA tirpalu, kuris taip pat surenkamas. Ląstelės atkeliamos tripsinu, kuris neutralizuojamas terpe su visais priedais. Tripsinas, terpė su atkilusiomis ląstelėmis perkeliama į mėgintuvėlius. Ląstelių suspensija centrifuguojama $1\ 000 \times g$ 7 min. 4 °C. Supernatantas nusiurbiamas, o ląstelės dažomos „*Tali™ Apoptosis Kit – Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide*” reagentais (A10788, *Thermo Fisher Scientific*) remiantis gamintojo rekomendacijomis. Fluorescencija matuojama 10^4 ląstelių naudojant „*BD FACSCalibur™*“ tėkmės citometrą ir „*CellQuest™ Pro*“ programinę įrangą. Duomenys analizuojami „*Flowing Software 2.5.1*“ programine įranga. Ląstelės klasifikuojamos kaip aneksino V ir propidžio jodido (PI) teigiamos, aneksino V teigiamos ir PI neigiamos, aneksino V neigiamos ir PI teigiamos, aneksino V ir PI neigiamos.

2.9. Imun fermentinis metodas „ELISA“

Ląstelių auginimo terpė surenkama į mėgintuvėlius ir centrifuguojama $1\ 000 \times g$ 7 min. 4 °C. Supernatantai perkeliama į naujus mėgintuvėlius ir laikomi -70 °C. IL8 koncentracija nustatoma rinkiniu „*ELISA MAX™ Standard Set Human IL-8*” (431501, *Biolegend*), remiantis gamintojo rekomendacijomis. IL8 koncentracija normalizuojama pagal ląstelių skaičių.

2.10. Ląstelių frakcijų atskyrimas

HCT116, SW620 ląstelės ir jų sublinijos auginamos 21,5 cm² lėkštutėse įprastais 2.2. lentelėje nurodytais tankiais. Po 96 val. ląstelės lizuojamos ir išfrakcionuojamos REAP metodu (Suzuki *et al.*, 2010). Išfrakcionuoti mėginiai laikomi -70 °C. Ląstelių frakcijos analizuojamos WB metodu, paimant didžiausią galimą mėginio tūrį.

2.11. Ląstelių gyvybingumo nustatymas

2.11.1. Ląstelių dažymas kristaliniu violetiniu

Metodas pagrįstas ląstelių dažymu kristaliniu violetiniu dažu, kuris prisijungia prie ląstelės baltymų. Pirmiausia nuo ląstelių nusiurbiamas terpė, o likusios negyvos ląstelės švelniai nuplaunamos PBS. PBS nusiurbiamas, o ląstelės fiksuojamos 10 min. 96 % etanolyje (32221, *Honeywell*). Užfiksuotos ląstelės dažomos 30 min. 0,05 % kristalinio violetinio tirpalu, ištirpintu 20 %

etanolyje. Prie ląstelių neprisijungęs dažas švelniai nuplaunamas 5-8 kartus tekančiu vandeniu. Po plovimo ląstelės išdžiovinamos. Dažas iš ląstelių išplaunamas eliacijos tirpalu (0,1 % etanoato (27221, *Honeywell*) ir 50 % etanolio tirpalas). Ištirpintas dažas skiedžiamas 10 kartų eliacijos tirpalu, o sugertis (A_{585}) matuojama „*Multiskan GO*“ spektrofotometru. Kontrolinių ląstelių sugerties vidurkis prilyginamas 100 %, o ląstelių gyvybingumas po poveikių yra išreiškiamas procentais nuo kontrolinių ląstelių.

2.11.2. MTT metodas

MTT metodas pagrįstas mitochondrijų oksidoreduktazių aktyvumo matavimu. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas) (M5655, *Sigma-Aldrich*) mitochondrijose redukuojamas iki violetinės spalvos produkto 1-(4,5-dimetiltiazol)-3,5-difenilformazano. Pagal susikaupusį jo kiekį yra vertinamas gyvybingumas. Pirmiausia yra nusiurbiamas terpė ir ląstelės kartą plaunamos DPBS. Po to ląstelės inkubuojamos 1 val. 37 °C, 5 % CO₂ ir 95 % drėgmės aplinkoje su 0,1 mg/mL MTT, ištirpintu DPBS. Po inkubacijos tirpalas nusiurbiamas, o susidaręs produktas iš ląstelių išplaunamas izopropanoliu. Neskiesto, iš ląstelių išplauto dažo sugertis (A_{570}), matuojama „*Multiskan GO*“ spektrofotometru. Kontrolinių ląstelių sugerties vidurkis prilyginamas 100 %, o ląstelių gyvybingumas po poveikių yra išreiškiamas procentais nuo kontrolinių ląstelių.

2.12. Baltymų tarpusavio sąveikų tinklo sudarymas

Baltymų tarpusavio sąveikų tinklas (PPI) sudarytas iš p62 (SQSTM1) ir apoptozėje (kaspazių-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) bei nekroptozėje (RIPK1, RIPK3, MLKL) dalyvaujančių baltymų, kurie yra tinklo pagrindiniai mazgai. Pagrindinių mazgų „*UniProtKB*“ numeriai pateikti 2.8 lentelėje.

2.8 lentelė. PPI tinklo pagrindinių mazgų baltymai.

Baltymas	UniProt KB nr.	Baltymas	UniProt KB nr.
SQSTM1	Q13501	CASP6	P55212
MLKL	Q8NB16	CASP7	P55210
RIPK1	Q13546	CASP8	Q14790
RIPK3	Q9Y572	CASP9	P55211
CASP2	P42575	CASP10	Q92851
CASP3	P42574		

Informacija apie pagrindinių mazgų fizines PPI surinkta naudojant duomenų bazę „*IntAct*“ (Orchard *et al.*, 2014). Sukurtas tinklas filtruotas nuo ne žmogaus baltymų, taip pat baltymų, nesusijusių su programuota ląstelių

žūtimi. Iš tinklo pašalinti baltymai, kurių genų raiška nėra nustatyta HCT116 ląstelėse. Tinklo PPI patikrintos nuo neegzistuojančių sąveikų „*Negatome*“ duomenų bazėje (Blohm *et al.*, 2014). PPI tinklo vizualizacijai naudota programinė įranga „*Cytoscape 3.9.1*“ (Shannon *et al.*, 2003).

2.13. Statistinė analizė

Statistinei analizei atlikti ir rezultatų vizualizavimui naudojama programinė įranga „*SigmaPlot 14.0*“. Duomenų normalumo prielaida tikrinama „*Shapiro-Wilk*“ kriterijumi. „*Brown-Forsythe*“ kriterijus naudojamas dispersijų palyginimui. Dvi nepriklausomos imtys, kurios yra pasiskirsčiusios pagal normalųjį skirstinį, lyginamos naudojant „*Stjudento t*“ kriterijų (kai dispersijos lygios) arba „*Welch t*“ kriterijų (kai dispersijos skiriasi). Dvi nepriklausomos imtys, kurios nėra pasiskirsčiusios pagal normalųjį skirstinį, palyginamos naudojant „*Mann-Whitney-Wilcoxon*“ kriterijų. Duomenys laikomi statistiškai reikšmingi, kai p reikšmė yra $\leq 0,05$. Grafikuose įvestas p reikšmės žymėjimas: #/*/^o, kai $p \leq 0,05$, ##/**/^{oo}, kai $p \leq 0,01$, ###/***/^{ooo}, kai $p \leq 0,001$.

3. REZULTATAI

Šiame darbe vertinome įgyto atsparumo chemoterapiniams vaistams molekulinis mechanizmus kolorektalinio vėžio ląstelėse (CRC). Tyrimams naudojome atsparias sublinijas, išvestas iš dviejų genetiškai ir fenotipiškai skirtingų žmogaus CRC ląstelių linijų HCT116 ir SW620. Kolorektalinės karcinomos ląstelių linija HCT116, išvesta iš pirminio naviko, yra priskiriama CMS1 tipui (Fichtner *et al.*, 2020), bei pasižymi MSI, CIMP, bei turi *KRAS*^{G13D} ir *PIK3CA*^{H1047R} mutacijas (Ahmed *et al.*, 2013). Kolorektalinės adenokarcinomos ląstelės SW620, išvestos iš limfmazgiuose susiformavusių metastazių, yra priskiriamos CMS2 tipui (Fichtner *et al.*, 2020), pasižymi CIMP, CIN, bei turi *KRAS*^{G12V} ir *TP53*^{R273H, P309S} mutacijas (Ahmed *et al.*, 2013). Atsparios sublinijos išvestos HCT116 ir SW620 ląsteles ilgą laiką kultivuojant su 5-FU (HCT116/FU ir SW620/FU) arba OxaPt (HCT116/OXA ir SW620/OXA). Šio darbo metu palyginome šių ląstelių atsparumą vertinant: 1) citokinių raišką; 2) serpinų kiekio pokyčius; 3) autofagijos baltymų kiekio pokyčius ir reikšmę atsparumui.

3.1. Ląstelių atsparumas 5-FU ir OxaPt

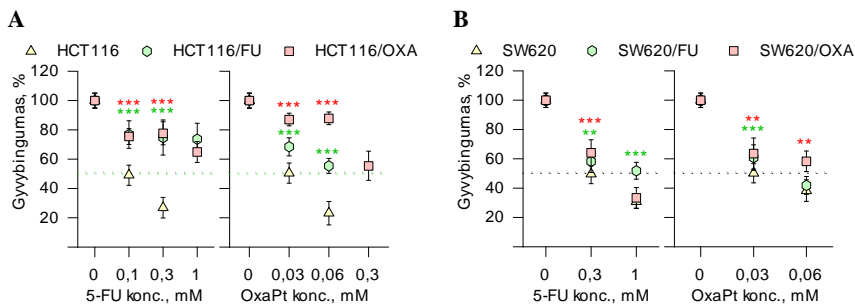
Norėdami palyginti atsparumo mechanizmus atspariose HCT116 ir SW620 ląstelėse, pirmiausia įvertinome ląstelių gyvybingumą po 5-FU ir OxaPt poveikio (3.1 pav.) ir atsparumo indeksą (RI, angl. *resistance index*) (3.1 lentelė). Gyvybingumo vertinimas atliktas remiantis 2.1 pav. schema.

HCT116 ląsteles veikiant 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU poveikiu gyvybingumas sumažėjo, atitinkamai, 50 % ir 70 %, o atsparių HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių – 20-30 %. HCT116/FU ląstelių gyvybingumą 1 mM 5-FU dozė sumažino 30 %, o HCT116/OXA – 40 %. Tuo tarpu 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozės sumažino HCT116 ląstelių gyvybingumą, atitinkamai, 50 % ir 80 %, o HCT116/FU – 30 % ir 50 %. Esant šioms OxaPt koncentracijoms HCT116/OXA ląstelių gyvybingumas mažėjo 10 %, o po 0,3 mM poveikio – 50 % (3.1 pav. A).

Paveikus SW620 ląsteles 0,3 mM ir 1 mM 5-FU gyvybingumas sumažėjo, atitinkamai, 50 % ir 70 %. Po šių dozių SW620/FU ląstelių gyvybingumas sumažėjo 40 % ir 50 %, o SW620/OXA ląstelių – 40 % ir 70 %. SW620 ląsteles veikiant 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozėmis gyvybingumas sumažėjo, atitinkamai, 50 % ir 60 %, SW620/FU ląstelių – 40 % ir 50 %, SW620/OXA – 30 % ir 50 % (3.1 pav. B).

Taip pat nustatėme, jog SW620 ląstelių linija, lyginant su HCT116, buvo atsparesnė didesnėms vaistų dozėms. SW620 ląsteles veikiant 0,3 mM 5-FU

ir 0,06 mM OxaPt dozėmis gyvybingumas buvo didesnis, atitinkamai, 1,9 ir 1,7 karto (abiems atvejais $p < 0,001$).



3.1 pav. HCT116 (A) ir SW620 (B) linių bei jų sublinijų gyvybingumas po 5-FU ir OxaPt poveikio. Gyvybingumas matuotas praėjus 48 val. po vaistų poveikio. Pateikta vidurkis \pm SD, $n \geq 3$. * – statistiškai reikšmingas skirtumas tarp tėvinių ir su 5-FU (žalia) ar OxaPt (raudona) išvestų ląstelių gyvybingumui, kai jos veikiamos vienodomis vaistų koncentracijomis. **/***, kai $p \leq 0,01/0,001$.

Eksperimentams 5-FU ir OxaPt koncentracijos parinktos remiantis HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių gyvybingumo regresine analize (Kukcinaviciute *et al.*, 2018) bei pritaikytos SW620 ląstelėms ir jų sublinijoms. Parinktos 0,1 mM 5-FU ir 0,03 mM OxaPt dozės HCT116 ląstelėms sukelia vidutinio stiprumo citotoksiškumą (CTT₅₀, citotoksiškumas, kai žūsta 50 % ląstelių) bei stiprų citotoksiškumą sukeliančios dozės – 0,3 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt, kai CTT₇₀₋₈₀.

Lyginant 5-FU ir OxaPt koncentracijas, sukeliančias CTT₅₀ (IC₅₀, vaisto koncentracija, nužudanti 50 % ląstelių), nustatėme RI. HCT116/FU ląstelės, išvestos kultivuojant su 5-FU, buvo daugiau nei 10 kartų atsparesnės 5-FU poveikiui ir 2 kartus OxaPt poveikiui lyginant su tėvinėmis HCT116 ląstelėmis. HCT116/OXA ląstelės, kurių atsparumas sukeltas su OxaPt, tapo 10 kartų atsparesnės ne tik OxaPt, bet ir 5-FU poveikiui lyginant su HCT116 ląstelėmis.

Iš SW620 ląstelių linijos išvestos SW620/FU ląstelės, kurių atsparumas sukeltas 5-FU poveikiu, lyginant su tėvine linija, tapo 3,3 karto atsparesnės 5-FU poveikiui ir 2 kartus OxaPt poveikiui. SW620/OXA ląstelės, išvestos kultivuojant su OxaPt, tapo 2 kartus atsparesnės OxaPt poveikiui lyginant su tėvine SW620 linija.

Lyginant tėvines HCT116 ir SW620 ląstelių linijas nustatėme, jog SW620 ląstelės buvo 3 kartus atsparesnės 5-FU poveikiui nei HCT116 ląstelių linija. Nors tėvinių HCT116 ląstelių atsparumas 5-FU poveikiui buvo mažesnis, tačiau su šiuo vaistu išvestų HCT116/FU ląstelių atsparumas buvo 3 kartus didesnis, nei SW620/FU ląstelių, kurios buvo išvestos iš SW620.

Tėvinės SW620 ląstelės, lyginant su HCT116, nepasižymėjo atsparumu OxaPt poveikiui.

3.1 lentelė. HCT116 ir SW620 ląstelėms bei jų sublinijoms būdingos 5-FU ir OxaPt IC₅₀ bei RI vertės.

Ląstelių linija	Vaistas	IC ₅₀ , mM	RI
HCT116	5-FU	0,1	-
	OxaPt	0,03	-
HCT116/FU	5-FU	> 1	> 10
	OxaPt	0,06	2
HCT116/OXA	5-FU	1	10
	OxaPt	0,3	10
SW620	5-FU	0,3	3*
	OxaPt	0,03	-*
SW620/FU	5-FU	1	3,3
	OxaPt	0,06	2
SW620/OXA	5-FU	0,3	-
	OxaPt	0,06	2

* lyginant su HCT116 ląstelėmis.

IC₅₀ – vaisto koncentracija, nužudanti 50 % ląstelių;

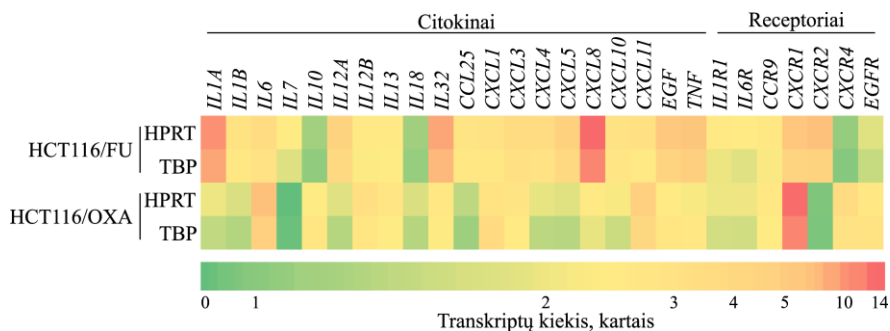
RI – santykis tarp vaistams atsparių ir jautrių ląstelių IC₅₀.

3.2. Citokinių raiška HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose

Citokinai yra svarbūs naviko vystymuisi ir atsparumui (1.4 skyrius), tad nustatėme, kaip atspariose HCT116/FU ir HCT116/OXA sublinijose, lyginant su tėvinėmis HCT116 ląstelėmis, pasikeitė citokinių transkriptų raiška, kurią vertinome pagal du atskaitos genus: *HPRT* ir *TBP*. Raiškos pokytį laikėme biologiškai reikšmingu, kai jis pagal abu atskaitos genus pasikeitė bent du kartus. Eksperimentai atlikti remiantis 2.1 pav. A schema.

Atlikę kPGR duomenų analizę nustatėme, kad HCT116/FU ląstelėse, lyginant su HCT116, padidėjo daugelio citokinių raiška. Šiose ląstelėse daugiau nei 5 kartus padidėjo šių transkriptų kiekis: *CXCL8* (pagal *HPRT* – 14,3; pagal *TBP* – 11,6 karto), *IL1A* (*HPRT* – 10,4; *TBP* – 8,2 karto) ir *IL32* (*HPRT* – 8,3; *TBP* – 6,5 karto). Vidutiniškai (3-5 kartus) padidėjo šių transkriptų kiekis: *TNF* (*HPRT* – 5,1; *TBP* – 4,2 karto), *EGF* (*HPRT* – 4,8; *TBP* – 3,6 karto), *CXCL5* (*HPRT* – 4; *TBP* – 3,2 karto) ir *IL12A* (*HPRT* – 3,7; *TBP* – 3,2 karto). *IL6*, *CXCL3*, *CXCL4* ir *CXCL10* raiška šiose ląstelėse padidėjo 2-3 kartus. Lyginant su HCT116 linija HCT116/OXA sublinijoje citokinių raiška pasikeitė nežymiai. Šiose ląstelėse padidėjo *IL-6* (*HPRT* – 5,6; *TBP* – 4 kartai), *CXCL1* (*HPRT* – 2,2; *TBP* – 3,1 karto) ir *CXCL11* (*HPRT* – 4,1; *TBP* – 3,4 karto) transkriptų kiekis, o *IL7* kiekis sumažėjo (*HPRT* – 7,6; *TBP* – 5,1 karto) (3.2 pav.).

Taip pat įvertinome citokinių receptorių koduojančių transkriptų raišką. Pasirinkome šiuos receptorių: IL1R1 (ligandai IL1 α ir IL1 β), IL6R (IL6), CCR9 (CCL25), CXCR1 (IL8 ir CXCL6), CXCR2 (IL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 ir CXCL7), CXCR4 (CXCL12 α ir β) bei EGFR (EGF). Nustatėme, kad HCT116/FU ląstelėse padidėjo *CXCR1* (*HPRT* – 5; *TBP* – 3,7 karto) ir *CXCR2* (*HPRT* – 5,6; *TBP* – 3,8 karto) transkriptų raišką, bet sumažėjo *CXCR4* (*HPRT* – 2; *TBP* – 2,5 karto). HCT116/OXA ląstelėse padidėjo *CXCR1* (*HPRT* – 14; *TBP* – 11,4 karto) ir *CXCR4* (*HPRT* – 2,9; *TBP* – 2,3 karto) transkriptų raišką, o *CXCR2* raišką šiose ląstelėse sumažėjo (*HPRT* – 2,8; *TBP* – 3,1 karto) (3.2 pav.). Tikslūs visų tirtų citokinių transkriptų raiškos pokyčiai (vidurkis \pm SD) pateikti 3 pr. 1 lentelėje.

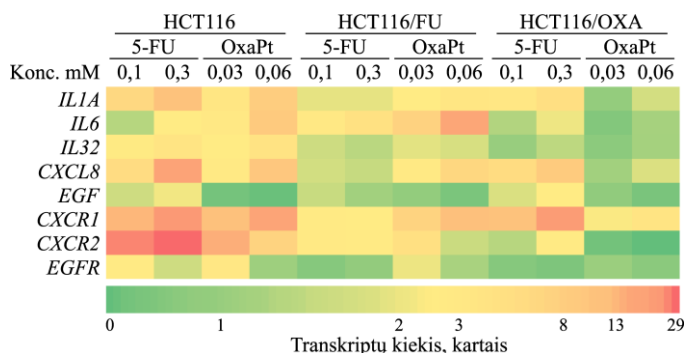


3.2 pav. Citokinių ir jų receptorių transkriptų kiekis HCT116/FU ir HCT116/OXA sublinijose lyginant su HCT116 linija. kPGR atlikta praėjus 96 val. po ląstelių užsėjimo. Transkriptų kiekis normalizuotas pagal *HPRT* ir *TBP* atskaitos genus. Pateiktas transkriptų kiekio (kartais) vidurkis, n = 3.

Toliau vertinome citokinių transkriptų raiškos pokyčius po 5-FU ir OxaPt poveikių. Tam pasirinkome: *IL1A*, *IL6*, *IL32*, *CXCL8*, *EGF*, *CXCR1*, *CXCR2* ir *EGFR*. HCT116 ląstelės ir jų sublinijos į 5-FU ir OxaPt poveikį reagavo skirtingai. HCT116 ląstelėse abu vaistai reikšmingai keitė citokinių raišką, HCT116/FU ląstelėse citokinių raišką labiau keitėsi po OxaPt poveikio, o HCT116/OXA ląstelėse priešingai – po 5-FU poveikio. HCT116 ląstelėse 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU poveikis padidino *IL1A* raišką, atitinkamai, 6,4 ir 11 kartų, *IL32* – 2,2 ir 3,8 karto, *CXCL8* – 5,4 ir 17,4 karto. *IL6* ir *EGF* transkriptų kiekis didėjo po 0,3 mM 5-FU dozės, atitinkamai, 2,3 ir 2,1 karto. 5-FU poveikis padidino ir citokinių receptorių transkriptų raišką. *CXCR1* raišką po 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU poveikio padidėjo, atitinkamai, 13,2 ir 19,5 karto, *CXCR2* – 23,6 ir 29,4 karto. *EGFR* raišką padidėjo 2,4 karto po 0,1 mM dozės. HCT116/FU ląstelėse po 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozių didėjo *IL6* raišką, atitinkamai, 2,9 ir 4,5 karto, *CXCR1* – 2,4 karto abiejų dozių atvejais, *CXCR2* – 2,8 ir 2,5 karto. HCT116/OXA ląstelėse 0,1 mM ir 0,3 mM

5-FU dozės didino *IL1A* raišką, atitinkamai, 3,3 ir 4,8 karto, *CXCL8* – 5,5 ir 9,1 karto, *CXCR1* – 10,9 ir 18,9 karto. *IL6*, *EGF* ir *CXCR2* kiekis didėjo po 0,3 mM 5-FU dozės, atitinkamai, 2, 2,3 ir 2,4 karto (3.3 pav.).

OxaPt poveikis labiausiai turėjo įtakos HCT116 ir HCT116/FU ląstelių transkriptų kiekiui. HCT116 ląstelėse 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozės padidino *IL1A* raišką, atitinkamai, 3,4 ir 8,6 karto, *IL6* – 3 ir 9,1 karto, *IL32* – 2,2 ir 4 kartus, *CXCL8* – 2,7 ir 9,8 karto, o *EGF* kiekis sumažėjo, atitinkamai 2 ir 2,5 karto. OxaPt šiose ląstelėse padidino ir citokininų receptorių transkriptų raišką. Po 0,03 mM ir 0,06 mM dozių *CXCR1* kiekis padidėjo, atitinkamai, 11 ir 17,1 karto, *CXCR2* – 15,1 ir 7,4 karto, o *EGFR* raiška padidėjo po 0,03 mM dozės 3,1 karto. HCT116/FU ląstelėse 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt didino *IL1A* raišką, atitinkamai, 2,3 ir 3,4 karto, *IL6* – 7,5 ir 16,7 karto, *CXCL8* – 2,8 ir 6,6 karto. Šios OxaPt dozės didino ir receptorių transkriptų raišką: *CXCR1* – 7,4 ir 11,4 karto, o *CXCR2* ir *EGFR* raiška padidėjo po 0,03 mM OxaPt poveikio, atitinkamai, 4,6 ir 2 kartus. HCT116/OXA ląstelėse OxaPt poveikis padidino tik *CXCR1* raišką, bet sumažino *CXCR2*. *CXCR1* raiška po 0,03 mM ir 0,06 mM dozių padidėjo 2,2 ir 3,7 karto, *CXCR2* – sumažėjo atitinkamai, 2 ir 3,1 karto (3.3 pav.). Tikslūs visų tirtų citokininų transkriptų raiškos pokyčiai (vidurkis ± SD) po vaistų poveikio pateikti 3 pr. 2 lentelėje.



3.3 pav. 5-FU ir OxaPt reikšmė citokininų ir jų receptorių transkriptų raiškai HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. kPGR atlikta praėjus 24 val. po vaistų poveikio. Citokininų raiška po vaistų poveikio lyginta su vaistais neveiktomis ląstelėmis. Transkriptų kiekis normalizuotas pagal *HPRT* atskaitos geną. Pateiktas transkriptų kiekio (kartais) techninių pakartojimų vidurkis, n = 3.

Apibendrinant citokininų transkriptų raiškos pokyčius galima teigti, jog: 1) HCT116/FU ląstelėse, lyginant su HCT116 linija, padidėjo šių citokininų transkriptų raiška: *IL1A*, *IL6*, *IL12A*, *IL32*, *CXCL3*, *CXCL4*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL10*, *EGF*, *TNF*, *CXCR1*, *CXCR2*, bet sumažėjo *CXCR4*, o HCT116/OXA ląstelėse padidėjo – *IL6*, *CXCL1*, *CXCL11*, *CXCR1* ir *CXCR4*, bei sumažėjo *IL7* ir *CXCR2* raiška; 2) HCT116 ląstelėse citokininų transkriptų

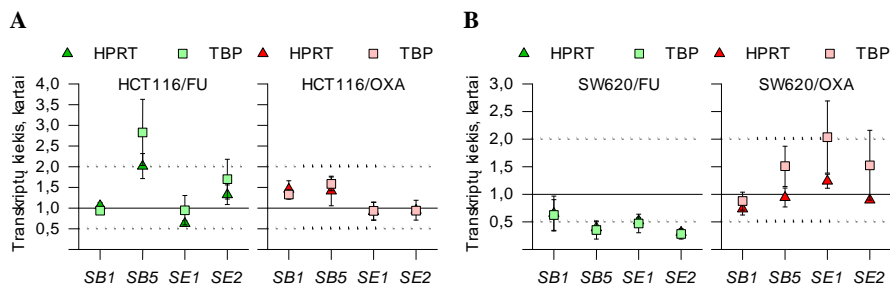
raišką didino 5-FU ir OxaPt, HCT116/FU ląstelėse – OxaPt, o HCT116/OXA ląstelėse – 5-FU.

3.3. Serpinų raiška HCT116 ir SW620 linijose bei jų sublinijose

Serpinais – tai serino proteazių inhibitoriai, kurie gali skatinti naviko vystymąsi (Mkaouar *et al.*, 2019), tačiau žinių, apie jų reikšmę chemoterapinių vaistų sukeltam atsparumui, nėra daug. Todėl toliau tyrėme serpinų kiekio pokyčius chemoterapiniams vaistams atspariose CRC ląstelėse.

3.3.1. Serpinų transkriptų raiškos pokyčiai

Tyrėme serpinų raišką HCT116 ir SW620 ląstelėse bei jų sublinijose. Eksperimentai atlikti remiantis 2.1 pav. A dalies schema. Serpinų raiškos tyrimams pasirinkome: serpiną B1 (SB1), B5 (SB5), E1 (SE1) ir E2 (SE2). Pirmiausia palyginome serpinų transkriptų raišką atspariose sublinijose su tėvinėmis linijomis. HCT116/FU sublinijoje padidėjo *SB5* raiška (pagal *HPRT* – 2, o pagal *TBP* – 2,8 karto) (3.4 pav. A). SW620/FU sublinijoje sumažėjo *SB5* (*HPRT* – 2,6 karto, *TBP* – 2,8 karto) ir *SE2* raiška (*HPRT* – 3,2; *TBP* – 3,6 karto) (3.4 pav. B). HCT116/OXA ir SW620/OXA sublinijose serpinų raiška nepasikeitė lyginant su tėvinėmis ląstelėmis.

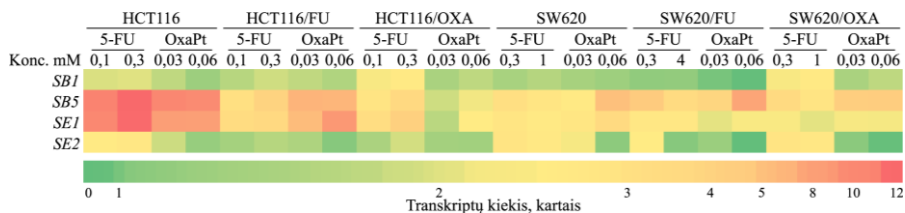


3.4 pav. Serpinų transkriptų raiškos pokyčiai HCT116/FU ir HCT116/OXA (A) bei SW620/FU ir SW620/OXA (B) sublinijose. kPGR atlikta praėjus 96 val. po ląstelių užsėjimo. Transkriptų kiekis normalizuotas pagal *HPRT* ir *TBP* atskaitos genus. Pokyčiai skaičiuoti nuo tėvinių linijų (ištisinė linija). Punktūrinės linijos žymi biologiškai reikšmingą raiškos pokytį. Pateikta vidurkis \pm SD, n = 3.

Toliau tyrėme, kaip 5-FU ir OxaPt keičia serpinų transkriptų raišką HCT116 ir SW620 ląstelėse bei jų atspariose sublinijose. Nustatėme, kad HCT116 ląstelėse 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozės didino *SB5* raišką, atitinkamai, 9,9 ir 11,9 karto, *SE1* – 9,5 ir 11,8 karto. *SE2* raiška šiose ląstelėse didėjo 2,2 karto po 0,3 mM 5-FU poveikio. HCT116/FU ląstelėse po šių 5-FU dozių *SB5* raiška didėjo, atitinkamai, 2,7 ir 3,7 karto, *SE1* – abiem atvejais

didėjo apie 3 kartus. HCT116/OXA ląstelėse 0,3 mM 5-FU poveikis 2 kartus padidino *SB1* raišką. Šias ląsteles veikiant 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozėmis *SB5* kiekis didėjo, atitinkamai, 2,4 ir 3,2 karto, o *SE1* – 3 ir 4 kartus. OxaPt didino *SB5* ir *SE1* raišką HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. HCT116 ląstelėse po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozių *SB5* raiška abiem atvejais padidėjo daugiau nei 9 kartus, o *SE1* raišką abi dozės padidino 7,8 karto. HCT116/FU ląstelėse po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt poveikių *SB5* raiška abiem atvejais padidėjo 6 kartus, o *SE1* – atitinkamai, 5,5 ir 8,3 karto (3.5 pav.).

SW620 ląstelėse 0,3 mM ir 1 mM 5-FU poveikis padidino *SB5*, *SE1* ir *SE2* raišką šiek tiek daugiau nei 2 kartus. SW620/FU ląstelėse 1 mM ir 4 mM 5-FU dozės *SB5* raišką padidino, atitinkamai, 4,3 ir 3,1 karto, o *SE1* – abiem atvejais 2,2 karto. SW620/OXA ląstelėse 1 mM 5-FU dozė 2 kartus padidino *SB1* raišką. Šias ląsteles veikiant 0,3 mM ir 1 mM 5-FU dozėmis *SB5* raiška didėjo, atitinkamai, 3,1 ir 2,4 karto, o *SE2* raiška abiejų dozių atvejais – daugiau nei 2 kartus. SW620 ląstelėse 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozės didino *SB5* raišką, atitinkamai, 2 ir 5,2 karto, *SE1* – 2,2 ir 3,1 karto. SW620/FU ląstelėse po šių dozių didėjo *SB5* raiška, atitinkamai, 3,5 ir 7,2 karto. Šiose ląstelėse 0,06 mM OxaPt dozė sumažino *SB1* ir *SE2* raišką 2,5 karto (abiem atvejais). SW620/OXA ląstelėse po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozių *SB5* raiška padidėjo abiem atvejais 4 kartus, o *SE2* raiška po 0,06 mM poveikio sumažėjo 2,3 karto (3.5 pav.). Visos 3.5 pav. tikslios reikšmės pateiktos 4 pr. 1 lentelėje.



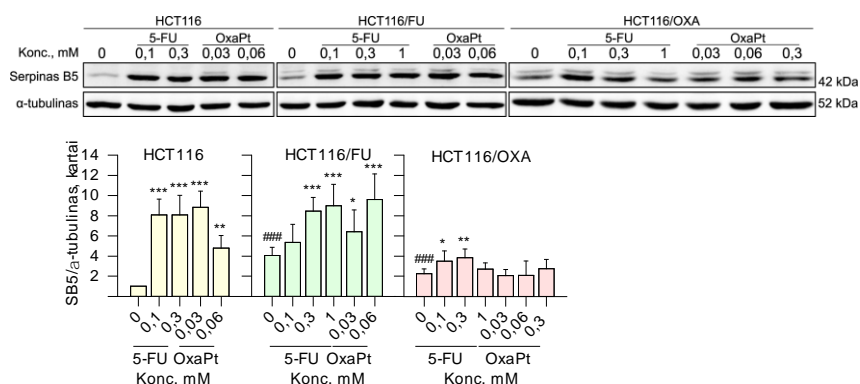
3.5 pav. 5-FU ir OxaPt reikšmė serpinų transkriptų kiekiui HCT116 ir SW620 ląstelėse bei jų sublinijose. kPGR atlikta praėjus 24 val. po vaistų poveikio. Serpinų raiška po vaistų poveikio lyginta su vaistais neveiktomis ląstelėmis. Transkriptų kiekis normalizuotas pagal *HPRT* atskaitos geną. Pateiktas transkriptų kiekio (kartais) vidurkis, n = 3.

Apibendrinant serpinų transkriptų raiškos rezultatus galime teigti, kad: 1) lyginant su tėvinėmis linijomis HCT116/FU ląstelėse padidėjo *SB5* raiška, o SW620/FU ląstelėse sumažėjo *SB5* ir *SE1*; 2) 5-FU didino *SB5* ir *SE1* raišką HCT116, SW620 ląstelėse ir jų sublinijose; 3) OxaPt didino *SB5* raišką HCT116, HCT116/FU bei SW620 ląstelėse ir jų atspariose sublinijose, o *SE1* raiška didėjo HCT116, HCT116/FU ir SW620 ląstelėse.

3.3.2. Serpino B5 baltymo kiekio pokyčiai

Tolimesniems tyrimams pasirinkome serpiną B5 (SB5), kurio kiekio pokyčius tyrėme baltymo lygiu. Žinoma, kad SB5 gali lokalizuotis įvairiose ląstelės vietose ir nuo to priklauso jo funkcijos (Goulet *et al.*, 2011). SB5 branduolio ir citoplazmos lokalizacija CRC atveju gali lemti ląstelių piktybiškumą (Gurzu, Jung, 2021), todėl pirmiausia išskyrėme HCT116 ir SW620 ląstelių bei jų sublinijų branduolių ir citoplazmų frakcijas, o mėginius išfrakcionavome SDS-PAGE. Nustatėme, kad SDS-PAGE matomos dvi SB5 formos priklauso skirtingoms ląstelių frakcijoms. Remiantis SB5 judėjimu SDS-PAGE nustatėme, kad citoplazmoje esančio SB5 dydis yra ~ 42 kDa, o branduolyje esantis SB5 juda lėčiau, tad jo dydis yra didesnis nei 42 kDa. Lyginant bendrą ląstelių lizatą nustatėme, kad HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose SB5 dominuoja citoplazmoje, o SW620 ląstelėse ir jų sublinijose – branduolyje (4 pr. 1 pav.).

Toliau tyrėme SB5 baltymo kiekio pokyčius. Nustatėme, kad HCT116/FU ląstelėse, lyginant su HCT116, SB5 kiekis padidėjo 4 kartus, o HCT116/OXA ląstelėse – 2,2 karto (abiem atvejais $p < 0,001$). HCT116 ląsteles veikiant 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozėmis SB5 kiekis abiem atvejais padidėjo 8,1 karto ($p < 0,001$). HCT116/FU ląstelėse SB5 kiekis didėjo po 0,3 mM ir po 1 mM 5-FU poveikių, atitinkamai, 8,5 ir 9 kartus ($p < 0,001$). HCT116/OXA ląstelėse SB5 kiekis didėjo po 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU poveikių, atitinkamai, 3,5 ($p = 0,03$) ir 3,9 ($p = 0,005$) karto. OxaPt poveikis SB5 kiekį didino HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. HCT116 ląstelėse po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozių SB5 kiekis didėjo, atitinkamai, 8,8 ($p < 0,001$) ir 4,8 ($p = 0,006$) karto, o HCT116/FU – 6,4 ($p = 0,03$) ir 9,6 ($p < 0,001$) karto (3.6 pav.).

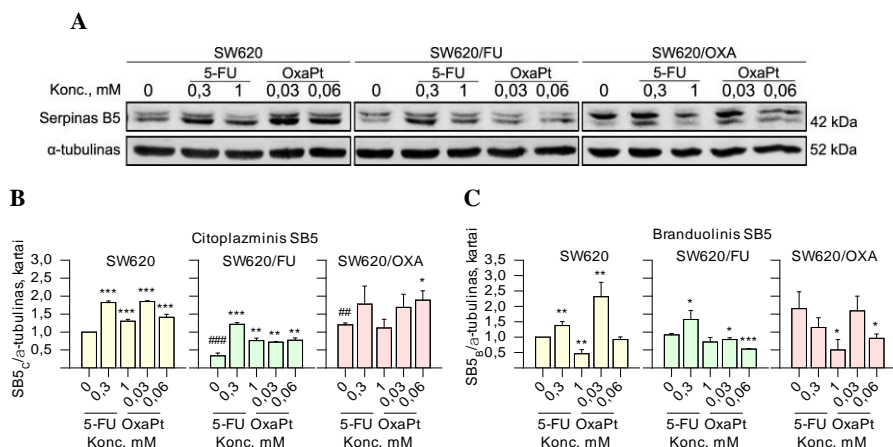


3.6 pav. Serpino B5 (SB5) kiekio pokyčiai HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Baltymo kiekis matuotas praėjus 48 val. po vaistų poveikio. Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: jautrių ir atsparių (#); veiktų ir neveiktų vaistais (*);*, kai $p \leq 0,05$; **, kai $p \leq 0,01$; ***/###, kai $p \leq 0,001$.

SW620 ląstelėse ir jų sublinijose SB5 baltymo kiekio pokyčius įvertinome citoplazmoje (SB5_C, 3.7 pav. A, B) ir branduolyje (SB5_B, 3.7 pav. A, C). Lyginant su SW620 ląstelėmis, SW620/FU sublinijoje SB5_C kiekis sumažėjo 3 kartus ($p < 0,001$), o SW620/OXA ląstelėse priešingai – padidėjo 1,2 karto ($p = 0,003$). SB5_B kiekis buvo vienodas tarp ląstelių linijų.

5-FU ar OxaPt didino SB5_C kiekį, o SB5_B kiekis keitėsi priklausomai nuo ląstelių ir vaisto ir jo dozės. SW620 ląstelėse 0,3 mM ir 1 mM 5-FU dozės SB5_C kiekį didino, atitinkamai, 1,8 ir 1,3 karto ($p < 0,001$), o SW620/FU ląstelėse – 3,6 ($p < 0,001$) ir 2,3 karto ($p = 0,002$). SW620/OXA ląstelėse SB5_C kiekis po 5-FU poveikio nesikeitė. SW620 ląstelių veikiant 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozėmis SB5_C kiekis didėjo, atitinkamai, 1,9 ir 1,4 karto ($p < 0,001$), o SW620/FU ląstelėse – 2,1 ($p = 0,001$) ir 2,3 ($p = 0,002$) karto. SW620/OXA ląstelėse SB5_C kiekis didėjo 1,6 karto po 0,06 mM OxaPt dozės ($p = 0,01$) (3.7 pav. A-B).

SW620 ląstelėse 0,3 mM 5-FU dozė didino SB5_B kiekį 1,4 karto ($p = 0,007$), o 1 mM dozė priešingai – mažino 2,2 karto ($p = 0,002$). SW620/FU ląstelėse 0,3 mM 5-FU poveikis didino SB5_B kiekį 1,5 karto ($p = 0,04$). SW620/OXA ląstelėse SB5_B kiekis mažėjo po 1 mM 5-FU poveikio 3,3 karto ($p = 0,02$). Esant 0,03 mM OxaPt dozei SB5_B kiekis SW620 ląstelėse padidėjo 2,3 karto ($p = 0,008$). SW620/FU ląstelėse SB5_B kiekis mažėjo po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozių, atitinkamai 1,2 ($p = 0,02$) ir 1,8 karto ($p < 0,001$). SW620/OXA ląstelėse SB5_B kiekis mažėjo po 0,06 mM OxaPt poveikio 2 kartus ($p = 0,04$) (3.7 pav. A ir C).



3.7 pav. Serpino B5 kiekio pokyčiai SW620 ląstelėse ir jų sublinijose. Citoplazmoje (SB5_C) (B) ir branduolyje (SB5_B) (C) esančio SB5 kiekis vertintas praėjus 48 val. po vaistų poveikio. Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: jautrių ir atsparių (#); veikėtų ir neveiktų vaistais (*); *, kai $p \leq 0,05$; **/###, kai $p \leq 0,01$; ***/####, kai $p \leq 0,001$.

Apibendrinant rezultatus galime padaryti šias išvadas: 1) lyginant su tėvinėmis linijomis HCT116/FU, HCT116/OXA ir SW620/OXA ląstelėse citoplazmoje esančio SB5 kiekis padidėjo, o SW620/FU ląstelėse sumažėjo; 2) 5-FU poveikis didino citoplazmoje esančio SB5 kiekį visose ląstelių linijose, išskyrus SW620/OXA, o OxaPt – jį didino visose ląstelių linijose, išskyrus HCT116/OXA; 3) Brandulyje esančio SB5 kiekis SW620 ląstelėse ir jų sublinijose priklausė nuo ląstelių linijos, vaisto ir jo koncentracijos.

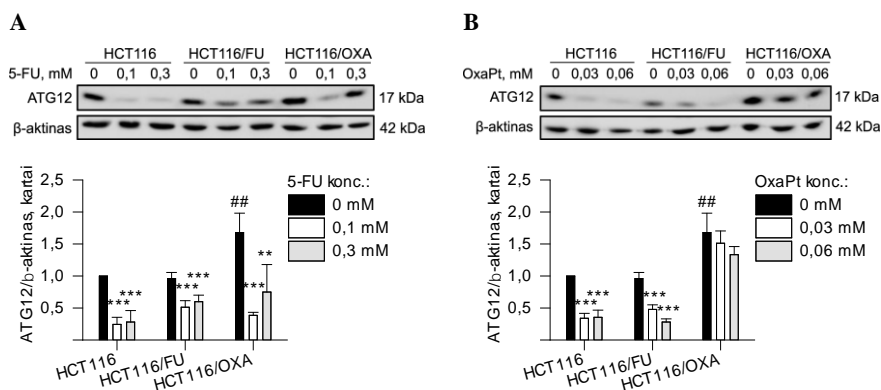
3.4. Autofagijos reikšmė atsparumui

Šiame darbe taip pat įvertinome autofagijos baltymų kiekio pokyčius atsparumą įgijusiose HCT116 ir SW620 ląstelių sublinijose ir kaip keitėsi po 5-FU ar OxaPt poveikio bei nustatėme autofagijos reikšmę OxaPt atsparumui. Eksperimentai atlikti remiantis 2.1 pav. B dalies schema. Vertinome ATG7, ATG12 ir LC3B-II formos (toliau LC3B-II) baltymų kiekį ir autofagijos srautą (intensyvumą). ATG7 ir ATG12 yra esminiai autofagijos baltymai, dalyvaujantys autofagosomų biogenezeje (1.6.1 poskyris). Autofagijos srautą vertinome pagal LC3B-II kiekio pokyčius. Susidarant autofaginėms membranoms, LC3B (LC3B-I forma) yra konjuguojamas su fosfatidiletanolaminu (PE) ir virsta LC3B-II forma. Ši forma yra naudojama kaip autofagijos žymuo, nes LC3B-II kiekis koreliuoja su autofagosomų kiekiu, o vykstant galutinėms autofagijos stadijoms, kai autofagosomos susilieja su lizosomomis, LC3B-II yra suskaidomas (Nakatogawa, 2020). Taigi, autofagijos srautas nustatomas pagal susikaupusį LC3B-II kiekį, kai degradacija autolizosomose yra sutrikdyta (Klionsky *et al.*, 2021). Šiame darbe autofagijos srauto matavimui ląstelės 4 val. prieš surinkimą buvo inkubuotos su 30 μ M chlorokvinu (CQ). CQ yra inhibitorius, didinantis lizosomų pH ir taip sutrikdantis skaidymą jose. Esant padidėjusiam autofagijos srautui mėginiuose su CQ yra nustatomas didesnis LC3B-II kiekis nei mėginiuose be CQ (M. Mauthe *et al.*, 2018).

3.4.1. ATG7 ir ATG12 baltymų kiekio pokyčiai

Šioje darbo dalyje pirmiausia įvertinome 0,3 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt įtaką *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* ir *ATG12* transkriptų raiškai HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Nustatėme, kad 5-FU poveikis mažino *ATG7* raišką visose ląstelių linijose, o *ATG12* raišką – HCT116 ir HCT116/OXA (5 pr. 1 pav. A). OxaPt poveikis mažino transkriptų raišką HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. *ATG3* raiška mažėjo HCT116 ląstelėse, o *ATG5*, *ATG7* ir *ATG12* – HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse (5 pr. 1 pav. B).

Ankstesnių tyrimu metu buvo nustatyta, kad HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelės pasižymėjo didesniu ATG7 baltymo kiekiu, o 5-FU ar OxaPt poveikis jį mažino HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. HCT116/OXA ląstelėse 5-FU mažino, o OxaPt atvirksčiai – didino ATG7 kiekį (Kukcinavičiūtė, 2019). Šiame darbe vertinome ATG12 baltymo kiekio pokyčius. Nustatėme, kad lyginant su HCT116 ląstelėmis HCT116/FU ląstelėse jis nepasikeitė, o HCT116/OXA ląstelėse padidėjo 1,7 karto ($p = 0,001$) (3.8 pav.). Toliau tyrėme, kaip šio baltymo kiekis keitėsi po 5-FU ar OxaPt poveikio. Nustatėme, kad ATG12 kiekis po 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozių HCT116 ląstelėse sumažėjo, atitinkamai, 4,1 ir 3,6 karto ($p < 0,001$), HCT116/FU ląstelėse – 1,9 ir 1,6 karto ($p < 0,001$), o HCT116/OXA ląstelėse – 4,4 ($p < 0,001$) ir 2,2 ($p = 0,007$) karto (3.8 pav. A). OxaPt poveikis ATG12 kiekį sumažino HCT116 ir HCT116/FU, bet ne HCT116/OXA ląstelėse. HCT116 ląstelėse 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozės ATG12 kiekį abiem atvejais sumažino apytiksliai 3 kartus ($p < 0,001$), o HCT116/FU ląstelėse, atitinkamai, 2 ir 3,4 karto ($p < 0,001$) (3.8 pav. B).



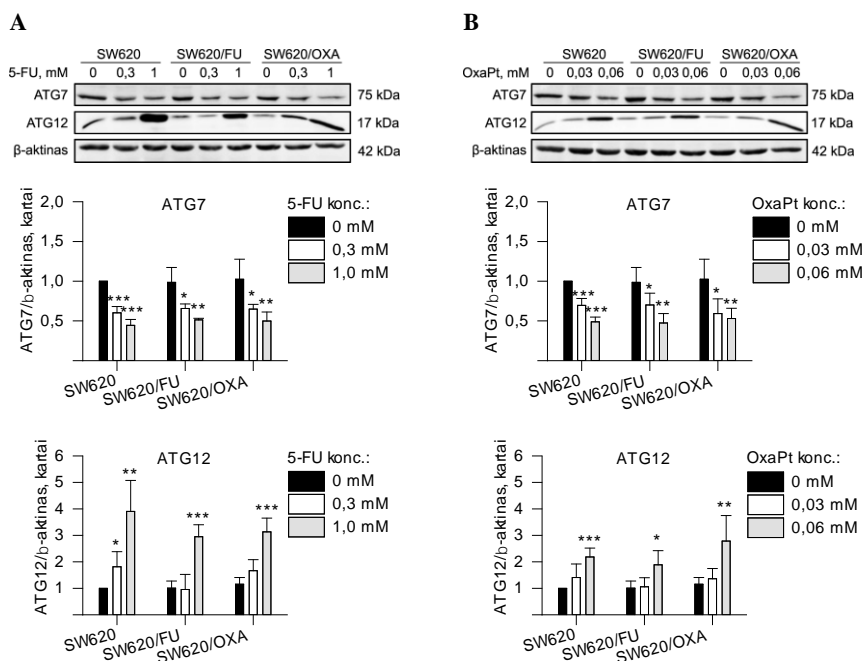
3.8 pav. ATG12 baltymo kiekio pokyčiai HCT116 ląstelėse ir jų atspariose sublinijose. ATG12 kiekis vertintas praėjus 48 val. po 5-FU (A) ir OxaPt (B) poveikio. Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: jautrių ir atsparių (#); vaistais veiktų ir neveiktų (*). ##/**, kai $p \leq 0,01$; ***, kai $p \leq 0,001$.

Toliau nustatėme *ATG3*, *ATG5*, *ATG7* bei *ATG12* transkriptų raiškos pokyčius po 1 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt poveikio SW620 ląstelėse ir jų sublinijose. Nustatėme, kad 5-FU poveikis nekeitė transkriptų raiškos (5 pr. 1 pav. C), o OxaPt poveikis didino *ATG3* ir *ATG12* transkriptų raišką visose ląstelių linijose (5 pr. 1 pav. D).

Šiose ląstelėse įvertinome ATG7 bei ATG12 baltymų kiekio pokyčius. Nustatėme, kad 5-FU ir OxaPt poveikis mažino ATG7 kiekį, o ATG12 kiekį priešingai – didino. SW620 ląstelėse 0,3 mM ir 1 mM 5-FU dozės ATG7 kiekį

sumažino, atitinkamai, 1,7 ir 2,3 karto ($p < 0,001$), SW620/FU ląstelėse – 1,5 ($p = 0,02$) ir 1,9 karto ($p = 0,001$), o SW620/OXA ląstelėse – 1,6 ($p = 0,02$) ir 2,1 karto ($p = 0,006$) (3.9 pav. A). ATG7 baltymo kiekis SW620 ląstelėse po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt poveikio mažėjo, atitinkamai, 1,4 ir 2 kartus ($p < 0,001$), SW620/FU ląstelėse – 1,4 ($p = 0,04$) ir 2,1 karto ($p = 0,001$), o SW620/OXA ląstelėse – 1,7 ($p = 0,04$) ir 1,9 ($p = 0,009$) karto (3.9 pav. B).

Priešingai nei ATG7 atveju, ATG12 baltymo kiekis didėjo po 5-FU ir OxaPt poveikio. SW620 ląstelėse po 0,3 mM ir 1 mM 5-FU poveikio jis didėjo, atitinkamai, 1,8 ($p = 0,03$) ir 3,9 ($p = 0,003$) karto, o SW620/FU ir SW620/OXA ląstelėse esant 1 mM 5-FU dozei – 3 kartus ($p < 0,001$) (3.9 pav. A). Esant 0,06 mM OxaPt dozei ATG12 kiekis didėjo: SW620 ląstelėse 2,2 karto ($p < 0,001$), SW620/FU – 1,9 karto ($p = 0,01$), o SW620/OXA – 2,8 karto ($p = 0,008$) (3.9 pav. B).



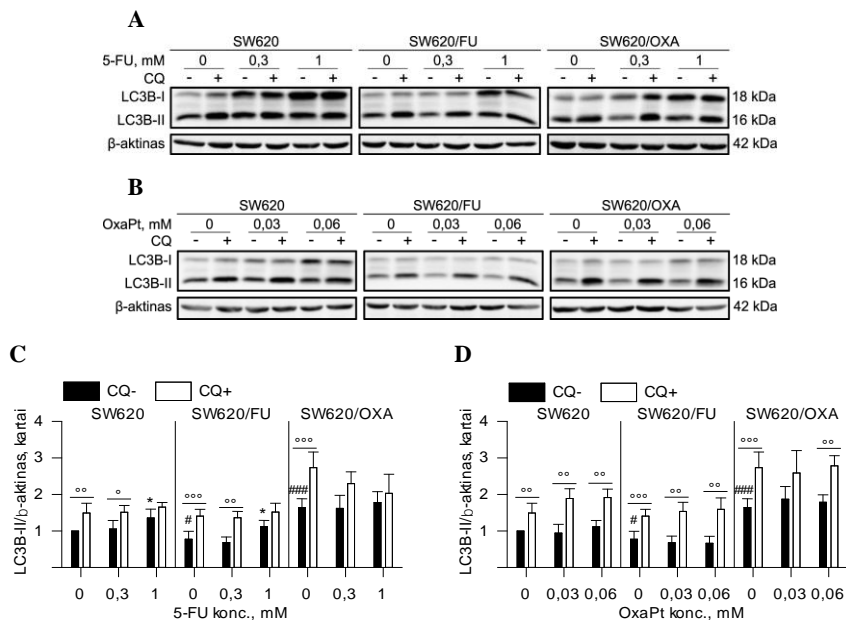
3.9 pav. ATG7 ir ATG12 baltymų kiekio pokyčiai SW620 ląstelėse bei jų atspariose sublinijose. Baltymų kiekis vertintas praėjus 48 val. po 5-FU (A) ar OxaPt (B) poveikio. Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: vaistais veiktu ir neveiktu (*). ***/**/***, kai $p \leq 0,05/0,01/0,001$.

Įvertinus baltymų kiekio pokyčius galime teigti, kad 1) HCT116/OXA ląstelėse ATG12 baltymo kiekis padidėjo lyginant su HCT116 linija; 2) 5-FU poveikis HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose mažino ATG12 kiekį, o OxaPt jį

mažino HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse; 3) 5-FU ir OxaPt SW620 ląstelėse ir jų sublinijose mažino ATG7 baltymo kiekį, o ATG12 priešingai – didino.

3.4.2. Autofagosomų kiekio ir autofagijos srauto pokyčiai

Ankstesnių tyrimų metu buvo nustatyta, kad HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose autofagijos srautas priklausė nuo ląstelių linijos ir poveikio (Kukcinavičiūtė, 2019). HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse, lyginant su HCT116, autofagijos srautas sumažėjo. 5-FU poveikis mažino autofagijos srautą HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse. OxaPt poveikio reikšmė autofagijos srautui priklausė nuo vaisto dozės ir ląstelių linijos. Įdomu tai, kad 0,06 mM OxaPt dozė HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse jį sumažino, o HCT116/OXA ląstelėse atvirkščiai – padidino (Kukcinavičiūtė, 2019). Šiame darbe vertinome, autofagosomų kiekį ir autofagijos srautą SW620 ląstelėse ir jų atspariose sublinijose (3.10 pav. ir 3.2 lentelė).



3.10 pav. Autofagosomų kiekio ir autofagijos srauto pokyčiai SW620 ląstelėse ir jų sublinijose. LC3B-II kiekis matuotas praėjus 48 val. po 5-FU (A ir C) ar OxaPt (B ir D) poveikio. Autofagijos srauto nustatymui ląstelės prieš surinkimą inkubuotos 4 val. su 30 μM CQ. Pateikta vidurkis + SD, n ≥ 3. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: jautrių ir atsparių (#); veiktų ir neveiktų vaistais (*); be ir su CQ (°). #/*/°, kai p ≤ 0,05; °°, kai p ≤ 0,01; ###/°°°, kai p ≤ 0,001.

Pirmiausia įvertinome autofagijos pokyčius atspariose sublinijose lyginant su tėvine linija. Lyginant su SW620 ląstelėmis, SW620/FU ląstelėse LC3B-II

kiekis, kuris koreliuoja su autofagosomų skaičiumi, sumažėjo 1,3 karto ($p = 0,03$), o SW620/OXA ląstelėse atvirkščiai – padidėjo 1,7 karto ($p < 0,001$). Autofagijos srautas SW620/FU ir SW620/OXA ląstelėse išaugo, atitinkamai, 1,3 karto ir 2,2 karto (3.10 pav. ir 3.2 lentelė).

Toliau vertinome vaistų poveikį autofagijai. SW620 ląstelėse 1 mM 5-FU dozė LC3B-II kiekį padidino 1,4 karto ($p = 0,03$), SW620/FU – 1,5 karto ($p = 0,04$), o SW620/OXA ląstelėse neturėjo įtakos (3.10 pav. A, C). OxaPt poveikis nekeitė LC3B-II kiekio (3.10 pav. B, D). Galiausiai tyrėme, autofagijos srautą. SW620 ir SW620/FU ląstelėse 1 mM 5-FU dozė jį sumažino 1,6 karto. SW620/OXA ląstelėse autofagijos srautas mažėjo po 0,3 mM ir 1 mM 5-FU dozių, atitinkamai, 1,6 ir 4,4 karto (3.10 pav. A, C ir 3.2 lentelė). OxaPt autofagijos srautą SW620 ir SW620/FU ląstelėse veikė priešingai – didino. Autofagijos srautas SW620 ląstelėse po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozių didėjo, atitinkamai, 1,9 ir 1,6 karto, o SW620/FU ląstelėse – 1,4 ir 1,5 karto. SW620/OXA ląstelėse autofagijos srautas mažėjo 1,5 karto po 0,03 mM OxaPt dozės (3.10 pav. B, D ir 3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Autofagijos srautas pagal LC3-II kiekį SW620 ląstelėse ir jų sublinijose.

Vaisto konc., mM	SW620		SW620/FU		SW620/OXA					
	Srautas	p	Srautas	p	Srautas	p				
-	0	0,49	0,009	0,63 ↑*	< 0,001	1,1 ↑*	< 0,001			
5-FU	0,3	0,46	-	0,02	0,68	-	0,003	0,68 ↓	> 0,05	
	1	0,3	↓	> 0,05	0,39	↓	> 0,05	0,25	↓	> 0,05
OxaPt	0,03	0,95	↑	0,002	0,86	↑	0,001	0,72	↓	> 0,05
	0,06	0,8	↑	0,001	0,93	↑	0,007	0,99	-	0,001

*Lyginant su SW620 linija. Kitur lyginama su vaistais neveiktomis ląstelėmis.

Srautas – skirtumas tarp CQ veiktų ir neveiktų ląstelių vidurkių. Srautas: padidėjo ↑; sumažėjo ↓; nesikeitė -; p – statistiškai reikšmingas skirtumas tarp CQ- ir CQ+.

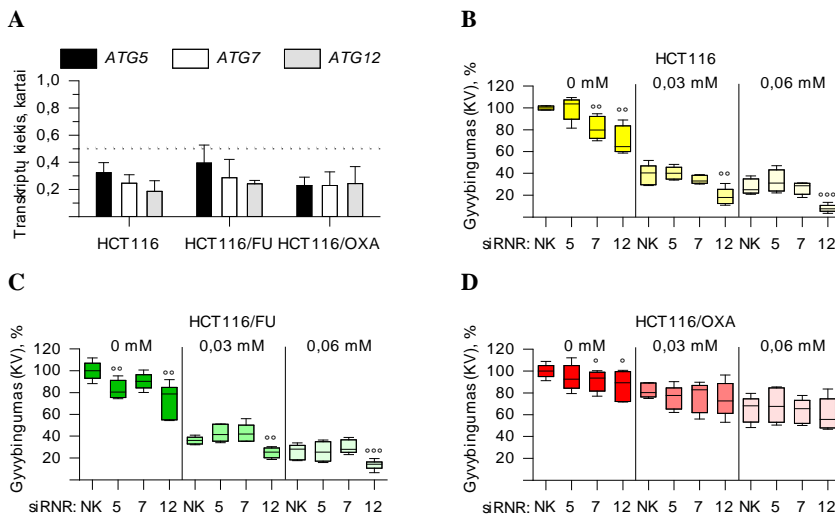
Apibendrinant šiuos rezultatus galima daryti išvadas, jog: 1) lyginant su SW620 ląstelėmis autofagosomų kiekis SW620/FU ląstelėse sumažėjo, o SW620/OXA – padidėjo, autofagijos srautas padidėjo abiejose sublinijose; 2) 5-FU didino LC3B-II kiekį SW620 ir SW620/FU ląstelėse, bet mažino autofagijos srautą visose tirtose ląstelėse; 3) OxaPt didino autofagijos srautą SW620 ir SW620/FU ląstelėse, o SW620/OXA ląstelėse jį mažino.

3.4.3. Autofagijos reikšmė HCT116 ląstelių ir jų sublinijų gyvybingumui

Kadangi HCT116/OXA ląstelėse po OxaPt poveikio autofagijos srautas didėjo, o po 5-FU – mažėjo (Kukcinavičiūtė, 2019), tad toliau siekėme įvertinti, kokią reikšmę OxaPt indukuotam atsparumui turi autofagija. Eksperimentai atlikti remiantis 2.2 pav. A schema. Specifinėmis siRNR

mažinome autofagosomų biogenezeje dalyvaujančių baltymų ATG5, ATG7 ir ATG12 kiekį. Transfekcijos efektyvumą vertinome kPGR. HCT116 ląstelėse *ATG5*, *ATG7* ir *ATG12* transkriptų raiška sumažėjo, atitinkamai, 3,1, 4,1 ir 5,4 karto, HCT116/FU – 2,6, 3,5 ir 4,1 karto, o HCT116/OXA ląstelėse *ATG5* ir *ATG7* raiška sumažėjo 4,4 karto, o *ATG12* – 4,1 karto (3.11 pav. A).

Atlikę KV testą nustatėme, kad *ATG7* ir *ATG12* raiškos tildymas sumažino HCT116 ląstelių gyvybingumą, atitinkamai, 19 % ($p = 0,007$) ir 30 % ($p = 0,006$). *ATG12* raiškos tildymas padarė šias ląsteles jautresnes OxaPt – abiejų dozių atvejais gyvybingumas mažėjo 20 % (0,03 mM atveju $p = 0,002$; 0,06 mM – $p < 0,001$) (3.11 pav. B). Vaistais neveiktų HCT116/FU ląstelių gyvybingumas mažėjo po *ATG5* ir *ATG12* raiškos tildymo, atitinkamai, 17 % ($p = 0,009$) ir 26 % ($p = 0,004$). *ATG12* raiškos tildymas 12 % sumažino HCT116/FU ląstelių gyvybingumą po abiejų OxaPt dozių (0,03 mM atveju $p = 0,002$; 0,06 mM – $p = 0,003$) (3.11 pav. C). *ATG7* ir *ATG12* raiškos tildymas sumažino HCT116/OXA ląstelių gyvybingumą, atitinkamai, 8 % ($p = 0,02$) ir 21 % ($p = 0,03$). Šių taikinių raiškos tildymas nekeitė HCT116/OXA ląstelių gyvybingumo po OxaPt poveikio (3.11 pav. D).



3.11 pav. *ATG5*, *ATG7* ir *ATG12* reikšmė OxaPt sukeltam atsparumui HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Transfekcijos efektyvumo vertinimas siRNR lygiu (A). HCT116 (B), HCT116/FU (C) ir HCT116/OXA (D) ląstelių gyvybingumas vertintas KV metodu po transfekcijos siRNR (72 val.) bei OxaPt poveikio (48 val.). A pav. legendos spalvos nurodo transkriptą ir jam atitinkamą specifinę siRNR. NK – nespecifinių siRNR mišinys, 5 – *ATG5*, 7 – *ATG7*, 12 – *ATG12* transkriptams specifinės siRNR. Pateikti: vidurkis + SD (A); viršutinė ir apatinė paklaidų riba, atitinkamai, 90-tas ir 10-tas procentiliai, dėžutė – IQR, linija – mediana (B-D), $n \geq 3$. ° nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp NK ir specifinėmis siRNR veiktų ląstelių. °/°/°/°°, kai $p \leq 0,05/0,01/0,001$.

Autofagijos biogenezeje dalyvaujančių molekulių reikšmę HCT116 ląstelių ir jų sublinijų gyvybingumui taip pat vertinome MTT metodu, kuris atspindi oksidoreduktazių aktyvumą (5 pr. 2 pav.). Nustatėme, kad MTT ir KV rezultatai sutapo tik iš dalies. *ATG12* raiškos tildymas sumažino HCT116 kontrolinių ir 0,03 mM OxaPt veiktų ląstelių metabolinį aktyvumą. Tačiau *ATG5* ir *ATG7* kiekio sumažinimas šiose ląstelėse esant 0,06 mM OxaPt dozei jį padidino (5 pr. 2 pav. A). Nutildžius *ATG7* ir *ATG12* raišką HCT116/FU ląstelėse esant OxaPt poveikiui metabolinis aktyvumas sumažėjo (5 pr. 2 pav. B). HCT116/OXA ląstelėse *ATG7* raiškos tildymas padidino metabolinį aktyvumą esant 0,03 mM OxaPt dozei (5 pr. 2 pav. C).

Įvertinus rezultatus galime teigti, kad *ATG12* yra svarbus HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių išgyvenimui, o jo raiškos tildymas didina HCT116 ir HCT116/FU ląstelių jautrumą OxaPt poveikiui.

3.5. p62 reikšmė atsparumui

Selektyvios autofagijos receptoriaus p62 kiekio pokyčius tyrėme HCT116 ir SW620 ląstelėse ir jų sublinijose. Pirmiausia nustatėme p62 kiekį bei autofagijos srautą. Kadangi autofagijos metu p62 yra suskaidomas, tad sutrikdžius lizosomų funkciją galima nustatyti autofagijos srautą (Yoshii, Mizushima, 2017, Ueno, Komatsu, 2020). Eksperimentai vykdyti pagal 2.1 pav. B schemą. Toliau, mažindami p62 kiekį specifine siRNR, vertinome jo reikšmę HCT116 ląstelių ir jų sublinijų atsparumui. Eksperimentai atlikti remiantis 2.2 pav. B schema.

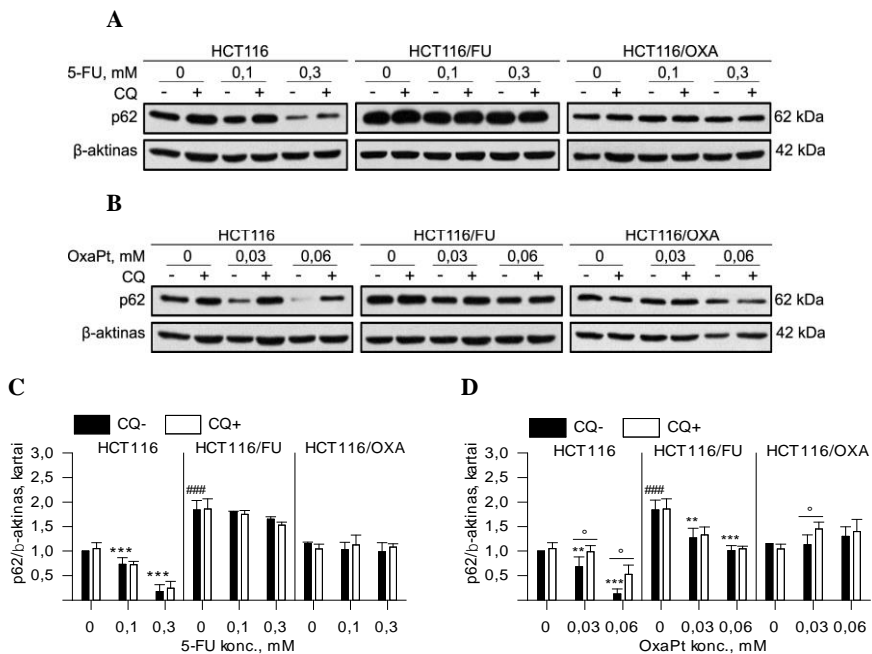
3.5.1. p62 kiekio pokyčiai

Nustatėme, kad HCT116/FU sublinijoje, lyginant su HCT116 ląstelėmis, p62 baltymo kiekis padidėjo 1,8 karto ($p < 0,001$), o jį koduojančio transkripto *SQSTM1* kiekis – 2 kartus. HCT116/OXA ląstelėse p62 kiekis nepasikeitė, tačiau 2 kartus sumažėjo *SQSTM1* kiekis (3.12 pav. ir 6 pr. 1 pav. A).

Ląsteles veikdami vaistais nustatėme, kad 5-FU poveikis p62 kiekį mažino tik tėvinėse HCT116 ląstelėse: 1,4 karto po 0,1 mM dozės ir 5,7 karto esant 0,3 mM 5-FU dozei (abiem atvejais $p < 0,001$) (3.12 pav. A, C). Stipri 5-FU dozė šiose ląstelėse reikšmingai mažino ir *SQSTM1* kiekį (6 pr. 1 pav. B). OxaPt poveikis mažino p62 kiekį tėvinėse HCT116 ląstelėse ir nedideliu atsparumu šiam poveikiui pasižyminčiose HCT116/FU ląstelėse. p62 kiekis po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt poveikio HCT116 ląstelėse sumažėjo, atitinkamai, 1,5 ($p = 0,007$) ir 7,9 ($p < 0,01$) karto, o HCT116/FU – 1,5

($p = 0,005$) ir 1,8 ($p < 0,001$) karto (3.12 pav. B, C). OxaPt nekeitė *SQSTM1* kiekio (6 pr. 1 pav. C).

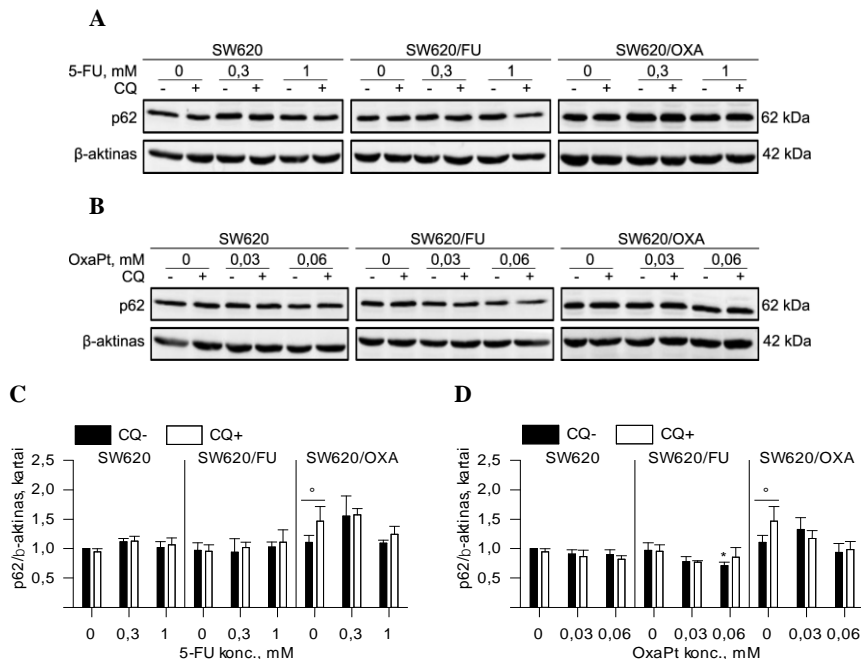
Toliau remiantis p62 kiekiu vertinome autofagijos srautą. Nustatėme, kad HCT116 ląstelėse 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozės jį didino, atitinkamai, 6,2 ir 8 kartus (abiem atvejais $p = 0,02$), o HCT116/OXA ląstelėse 0,03 mM OxaPt poveikis jį didino 5 kartus ($p = 0,049$) (3.12 pav.).



3.12 pav. p62 baltymo kiekis HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. p62 baltymo kiekio pokyčiai praėjus 48 val. po 5-FU (A ir C) ar OxaPt (B ir D) poveikio. Autofagijos srauto nustatymui ląstelės prieš surinkimą inkubuotos 4 val. su 30 μ M CQ. Pateikta vidurkis \pm SD, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: jautrių ir atsparių (#); veiktų ir neveiktų vaistais (*); be ir su CQ ($^{\circ}$). $^{\circ}$, kai $p \leq 0,05$; **, kai $p \leq 0,01$; ###/***, kai $p \leq 0,001$.

SW620 ląstelėse ir jų sublinijose p62 kiekis ir autofagijos srautas keitėsi neįžymiai. SW620/FU ląstelėse 0,06 mM OxaPt poveikis p62 kiekį sumažino 1,4 karto ($p = 0,02$). Autofagijos srautas SW620/OXA ląstelėse, lyginant su SW620, padidėjo ($p = 0,048$), o vaistų poveikis jį panaikino (3.13 pav.).

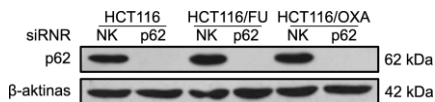
Įvertinę p62 baltymo kiekio pokyčius galime teigti, kad 1) lyginant su tėvinėmis linijomis HCT116/FU ląstelėse p62 kiekis padidėjo, o SW620/OXA ląstelėse padidėjo autofagijos srautas; 2) 5-FU poveikis mažino p62 kiekį HCT116 ląstelėse, o OxaPt jį mažino – HCT116, HCT116/FU ir SW620/FU ląstelėse; 3) OxaPt poveikis padidino autofagijos srautą HCT116 ir HCT116/OXA ląstelėse, o SW620/OXA ląstelėse 5-FU ir OxaPt poveikis autofagijos srautą priešingai – sumažino.



3.13 pav. p62 baltymo kiekis SW620 ląstelėse ir jų sublinijose. p62 baltymo kiekio pokyčiai praėjus 48 val. po 5-FU (A ir C) ar OxaPt (B ir D) poveikio. Autofagijos srauto nustatymui ląstelės prieš surinkimą inkubuotos 4 val. su 30 μ M CQ. Pateikta vidurkis \pm SD, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: veiktų ir neveiktų vaistais (*); be ir su CQ ($^{\circ}$). $^{\circ}/^{\circ}$, kai $p \leq 0,05$.

3.5.2. p62 reikšmė HCT116 ląstelių ir jų sublinijų atsparumui

Tolimesniems tyrimams pasirinkome HCT116 ląsteles ir jų sublinijas, nes HCT116/FU sublinijoje nustatėme padidėjusį p62 kiekį. Norėdami nustatyti p62 reikšmę atsparumui vertinome p62 raiškos tildymo įtaką ląstelių gyvybingumui. Jį matavome KV ir MTT metodais. p62 raišką mažiname *SQSTM1* transkriptui specifine siRNR, kurios efektyvumas baltymo lygiu praėjus 48 val. po transfekcijos visose ląstelėse buvo 100 % (3.14 pav.).

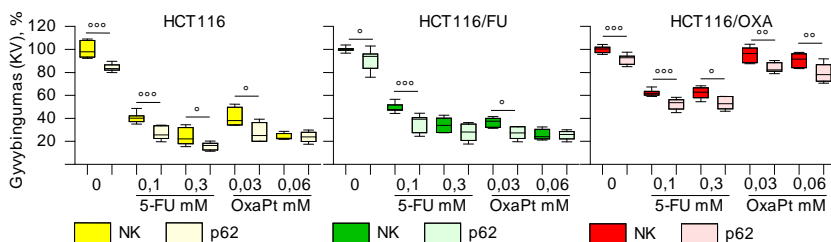


3.14 pav. p62 raiškos tildymo efektyvumas HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. p62 baltymo kiekis vertintas praėjus 48 val. po transfekcijos. NK – nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. $n = 3$.

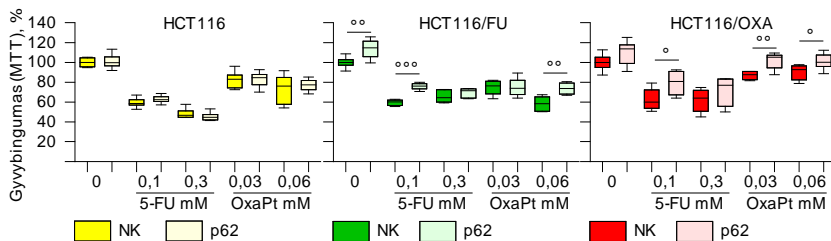
KV metodas, atspindintis prie augimo paviršiaus prikibusių adherentinių ląstelių kiekį, parodė, kad p62 raiškos tildymas sumažino kontrolinių ląstelių gyvybingumą ir darė jas jautresnes vaistų poveikiui (3.15 pav. A). Kontrolinių

HCT116 ląstelių gyvybingumas sumažėjo 16 % ($p < 0,001$), HCT116/FU – 10 % ($p = 0,01$), o HCT116/OXA – 8 % ($p < 0,001$). HCT116 ląstelių gyvybingumas po 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozių sumažėjo, atitinkamai, 13 % ($p < 0,001$) ir 8 % ($p = 0,03$), o po 0,03 mM OxaPt dozės – 14 % ($p = 0,01$). HCT116/FU ląstelės tapo jautresnės 0,1 mM 5-FU ir 0,03 mM OxaPt poveikiui – gyvybingumas sumažėjo, atitinkamai, 13 % ($p < 0,001$) ir 9 % ($p = 0,01$). HCT116/OXA ląstelių gyvybingumas mažėjo 9 % esant 0,1 mM ir 0,3 mM 5-FU dozėms (p reikšmės, atitinkamai, $< 0,001$ ir $0,01$) bei 11 % po 0,03 mM ir 0,06 mM OxaPt dozių (p reikšmės abiem atvejais $0,009$).

A



B



3.15 pav. p62 reikšmė HCT116 ląstelių ir jų sublinijų atsparumui. Ląstelių gyvybingumas matuotas KV (A) ir MTT (B) metodais praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po vaistų poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta: viršutinė ir apatinė paklaidų riba, atitinkamai, 90-tas ir 10-tas procentiliai, dėžutė – IQR, linija – mediana, $n \geq 3$. ° nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp NK ir p62. °/°°/°°°, kai $p \leq 0,05/0,01/0,001$.

Atlikus gyvybingumo matavimą MTT metodu, kuris parodo oksidoreduktazių aktyvumą (toliau metabolinis aktyvumas), nustatėme, kad p62 raiškos tildymas jį didina vaistams atspariose ląstelėse (3.14 pav. B). p62 raiškos tildymas padidino HCT116/FU ląstelių metabolinį aktyvumą 14 % ($p = 0,005$), o esant 0,1 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt dozėms jis didėjo, atitinkamai, 16 % ($p < 0,001$) ir 15 % ($p = 0,003$). HCT116/OXA ląstelėse metabolinis aktyvumas po p62 raiškos tildymo didėjo 17 % ($p = 0,03$) esant 0,1 mM 5-FU dozei, 15 % ($p = 0,002$) – 0,03 mM ir 11 % ($p = 0,03$) 0,06 mM OxaPt poveikiams.

Kadangi vertinant ląstelių gyvybingumą KV ir MTT metodais gavome priešingus rezultatus atspariose sublinijose, todėl po p62 raiškos tildymo įvertinome ląstelių skaičių (6 pr. 2 pav.). Nustatėme, kad p62 raiškos tildymas sumažino HCT116 ir HCT116/FU ląstelių skaičių 20 % (atitinkamai, $p = 0,005$ ir $p < 0,001$), o HCT116/OXA ląstelių – 24 % ($p < 0,001$).

Įvertinę gyvybingumą po p62 raiškos tildymo galime teigti, kad 1) p62 raiškos tildymas mažino kontrolinių ir 5-FU ar OxaPt veiktų HCT116 ląstelių ir jų sublinijų gyvybingumą; 2) p62 raiškos tildymas didino HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių metabolinį aktyvumą.

3.5.3. p62 reikšmė ląstelių žūtyje dalyvaujančių baltymų kiekiui

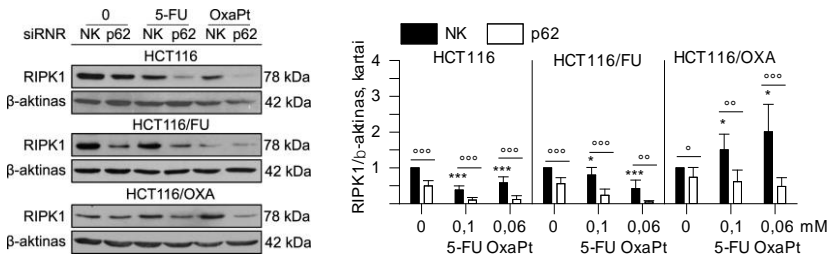
Norėdami iširti p62 reikšmę ląstelių išgyvenimui, pirmiausia įvertinome jo ryšį su ląstelių žūtyje dalyvaujančiais baltymais. Tam sudarėme baltymų tarpusavio sąveikų tinklą (PPI) (6 pr. 3 pav.). Pradiniams mazgams pasirinkome p62 ir baltymus, kurie dalyvauja apoptozėje (iniciacijos kaspazės-2, 8, 9, 10 ir vykdomosios kaspazės-3, 6, 7) arba nekrotozėje (RIPK1, RIPK3 ir MLKL). Kai kurie baltymai, tokie kaip kaspazė-8 ar RIPK1, gali dalyvauti abiejų žūčių reguliavime (Shalini *et al.*, 2015). Iš baltymų tinklo matome, kad RIPK1 ir kaspazė-8 gali tiesiogiai sąveikauti su p62. Žinoma, kad šie baltymai sudaro kompleksus ir gali reguliuoti ląstelių išgyvenimo procesus (J. Chen *et al.*, 2019). Todėl tyrėme p62 raiškos tildymo įtaką nekrotozėje ir apoptozėje dalyvaujančių baltymų kiekiui HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Tam pasirinkome 0,1 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt poveikius, kuriems esant p62 raiškos tildymas didina atsparių ląstelių metabolinį aktyvumą. Eksperimentai atlikti remiantis 2.2 pav. B schema.

Pirmiausia įvertinome p62 raiškos tildymo įtaką autofagijos srautui matuojant LC3-II kiekį po CQ poveikio. Tam pasirinkome HCT116/FU ląsteles, kuriose p62 kiekis padidėjo, lyginant su HCT116, o p62 raiškos tildymas esant 0,1 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt dozėms didino metabolinį aktyvumą. Nustatėme, kad p62 raiškos tildymas panaikino autofagijos srautą kontrolinėse ir OxaPt veiktose ląstelėse, o 5-FU jo nedidino (6 pr. 4 pav.).

Toliau tyrėme p62 tildymo įtaką ląstelių išgyvenimą valdančių baltymų kiekiui. RIPK1 tiesiogiai sąveikauja ir sudaro kompleksą su p62 (Xu *et al.*, 2021), be to sąveikauja su daugeliu kitų baltymų, tame tarpe ir ląstelės žūties reguliatoriais, tokiais kaip RIPK3, kaspazė-8, CFLAR, FAS, TRAF2, TRADD ar FADD (6 pr. 4 pav.), tad tyrėme p62 reikšmę RIPK1 kiekiui. Pirmiausia vertinome RIPK1 kiekio pokyčius po vaistų poveikio. 5-FU ir OxaPt mažino RIPK1 kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse, o HCT116/OXA ląstelėse priešingai – didino. HCT116 ląstelėse 5-FU poveikis

RIPK1 kiekį mažino 2,6 karto, o OxaPt – 1,7 karto (abiem atvejais $p < 0,001$). HCT116/FU ląstelėse RIPK1 kiekis mažėjo 1,3 karto po 5-FU ($p = 0,03$) ir 2,4 karto po OxaPt ($p < 0,001$) poveikio. 5-FU ir OxaPt poveikiai RIPK1 kiekį HCT116/OXA ląstelėse didino, atitinkamai, 1,5 ($p = 0,04$) ir 2 kartus ($p = 0,02$) (3.16 pav. juodi stulpeliai).

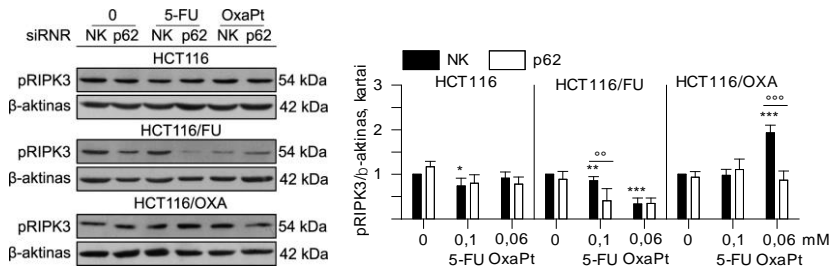
Nutildžius p62 raišką nustatėme, kad RIPK1 kiekis sumažėjo visose ląstelėse. HCT116 kontrolinėse ląstelėse jis mažėjo 2 kartus, po 5-FU poveikio – 4 kartus, o po OxaPt – 5 kartus (visais atvejais $p < 0,001$). HCT116/FU kontrolinėse ląstelėse sumažėjo 1,8 karto, po 5-FU poveikio – 3,4 karto (abiem atvejais $p < 0,001$), o po OxaPt – 9,1 karto ($p = 0,003$). Vaistais neveiktose HCT116/OXA ląstelėse p62 raiškos tildymas RIPK1 kiekį sumažino 1,4 karto ($p = 0,03$), esant 5-FU poveikiui – 2,5 karto ($p = 0,007$), OxaPt – 4,2 karto ($p < 0,001$) (3.16 pav. juodi stulpeliai lyginant su baltais).



3.16 pav. RIPK1 kiekis po p62 raiškos tildymo HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. RIPK1 kiekis matuotas praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po vaistų poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkis ± SD; $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: veikūt ir neveiktų vaistais (*); NK ir p62 (°). */°, kai $p \leq 0,05$; °°, kai $p \leq 0,01$; ***/°°, kai $p \leq 0,001$.

Kadangi RIPK1 kiekis priklausė nuo p62, tad toliau tyrėme p62 raiškos tildymo įtaką nekroptozei svarbaus RIPK3 kiekiui. Žinoma, kad RIPK1 gali sąveikauti su RIPK3 per RHIM domeną, sukelti auto- arba transfosforilinimą ir jį aktyvinti (Karlowitz, van Wijk, 2023). Šiame darbe vertinome fosforilintą RIPK3 (pRIPK3) formą, kuri dalyvauja nekroptozėje (Ser227) (Dhuriya, Sharma, 2018). Nustatėme, kad HCT116 ląstelėse 5-FU poveikis 1,4 karto ($p = 0,03$) sumažino pRIPK3 kiekį. HCT116/FU ląstelėse pRIPK3 kiekis mažėjo po 5-FU ir OxaPt poveikio, atitinkamai, 1,2 ($p = 0,007$) ir 3 kartus ($p < 0,001$). HCT116/OXA ląstelėse pRIPK3 kiekis kito priešingai – didėjo 2 kartus po OxaPt poveikio ($p < 0,001$) (3.17 pav. juodi stulpeliai).

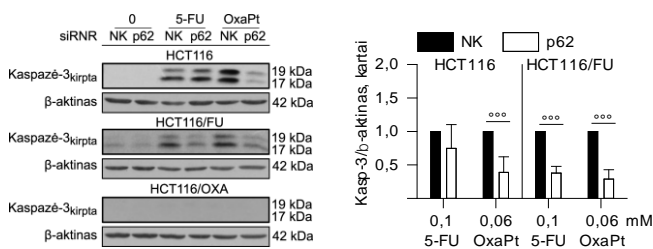
p62 raiškos tildymas 2,1 karto ($p = 0,008$) sumažino pRIPK3 kiekį HCT116/FU ląstelėse po 5-FU poveikio, o HCT116/OXA ląstelėse 2,2 karto ($p < 0,001$) po OxaPt poveikio (3.17 pav. juodi stulpeliai lyginant su baltais).



3.17 pav. pRIPK3 kiekis po p62 raiškos tildymo HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. pRIPK3 kiekis vertintas praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po vaistų poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkis + SD; $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: veikty ir neveiktų vaistais (*); NK ir p62 ($^{\circ}$). *, kai $p \leq 0,05$; **/ $^{\circ}$, kai $p \leq 0,01$; ***/ $^{\circ}$, kai $p \leq 0,001$.

OxaPt poveikis HCT116/OXA ląstelėse didino RIPK1 ir pRIPK3 kiekį, tad tyrėme, ar šis poveikis sukelia nekroptozę. Tai atlikome vertindami HCT116 ir jų atsparių sublinijų gyvybingumą po RIPK3 inhibitoriaus GSK843 poveikio. Nustatėme, kad GSK843 neturėjo įtakos 5-FU ir OxaPt veikty ląstelių gyvybingumui (duomenys nepateikti), tad nekroptozės HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose šie vaistų poveikiai neindukuoja.

Toliau tyrėme p62 raiškos tildymo reikšmę apoptozėje dalyvaujančios kaspazės-3 kiekiui. Nustatėme, kad 5-FU ir OxaPt poveikiai aktyvina kaspazę-3 HCT116 ir HCT116/FU, bet ne HCT116/OXA ląstelėse (3.18 pav.), o p62 raiškos tildymas jos aktyvumą mažino. HCT116 ląstelėse p62 raiškos tildymas esant 5-FU poveikiui jį sumažino 2,6 karto. HCT116/FU ląstelėse kaspazės-3 aktyvumas po p62 raiškos tildymo esant 5-FU ar OxaPt poveikiui mažėjo, atitinkamai, 2,7 ir 3,5 karto (visais atvejais $p < 0,001$) (3.18 pav. juodi stulpeliai lyginant su baltais).



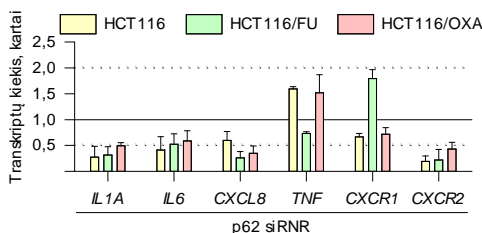
3.18 pav. Aktyvi kaspazė-3 po p62 raiškos tildymo HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Kirtos (aktyvios) kaspazės-3 kiekis nustatytas praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po vaistų poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$. $^{\circ}$ žymi statistiškai reikšmingą skirtumą tarp NK ir p62. $^{\circ}$, kai $p \leq 0,001$.

Taip pat įvertinome p62 raiškos tildymo įtaką apoptozei ląsteles dažant aneksinu V ir propidžio jodidu (PI) bei matuojant BAX ir BCL2 santykį. Nustatėme, kad p62 raiškos tildymas nedidino žuvusių ląstelių kiekio (6 pr. 5 pav. A), bet sumažino BAX/BCL2 santykį HCT116/FU ląstelėse po 5-FU ir OxaPt poveikio (6 pr. 5 pav. B).

Apibendrinant gautus rezultatus galima teigti: 1) p62 raiškos tildymas mažino RIPK1 kiekį kontrolinėse ir 5-FU ar OxaPt veiktose HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose 2) pRIPK3 kiekis mažėjo po p62 raiškos tildymo HCT116/FU ląstelėse po 5-FU poveikio ir HCT116/OXA ląstelėse po OxaPt poveikio; 3) p62 raiškos tildymas sumažino kaspazės-3 aktyvumą HCT116 ląstelėse po OxaPt poveikio, o HCT116/FU – po 5-FU ir OxaPt poveikių.

3.5.4. p62 reikšmė citokininų kiekiui

Kadangi p62 raiškos tildymas mažino apoptozėje ir nekrotozėje dalyvaujančių baltymų kiekį, o tai nepaaiškino sumažėjusio ląstelių gyvybingumo, todėl toliau vertinome p62 reikšmę ląstelių proliferaciją reguliuojančių citokininų raiškai. Pasirinkome citokinus, kurių raiška padidėjo chemoterapiniams vaistams atspariose ląstelėse (3.2 skyrius).

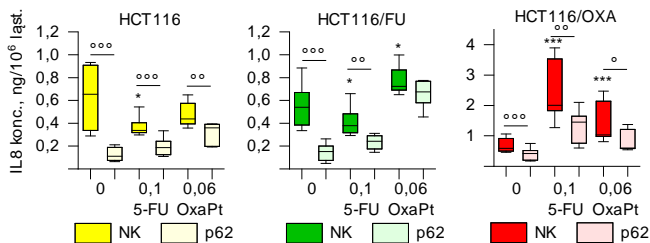


3.19 pav. Citokininų transkriptų raiška po p62 raiškos tildymo HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. kPGR atlikta praėjus 48 val. po siRNR transfekcijos. Transkriptų raiška normalizuotas pagal *HPRT* atskaitos geną. Pokyčiai skaičiuoti pagal ląsteles, veiktas žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišiniu (ištininė linija). Punktyrinės linijos žymi biologiškai reikšmingą kiekio pokytį. Pateikta vidurkis + SD, n = 3.

Atlikę kPGR nustatėme, kad p62 raiškos tildymas sumažino *IL1A* transkriptų raišką visose ląstelių linijose: HCT116 – 3,6 karto, HCT116/FU – 3,2 karto, o HCT116/OXA – 2 kartus. *IL6* raiška sumažėjo tik HCT116 ląstelėse 2,4 karto. *CXCL8* kiekis po p62 raiškos tildymo sumažėjo atspariose sublinijose: HCT116/FU – 3,9 karto, o HCT116/OXA – 2,9 karto. Citokininų receptoriaus *CXCR2* transkriptų raiška sumažėjo visose ląstelėse: HCT116 – 5,2 karto, HCT116/FU – 4,6 karto, HCT116/OXA – 2,3 karto (3.19 pav.).

Kadangi p62 raiškos tildymas mažino *CXCL8* raišką atspariose sublinijose, todėl tyrėme jo koduojamo baltymo IL8 kiekį. IL8 yra sekretuojamas

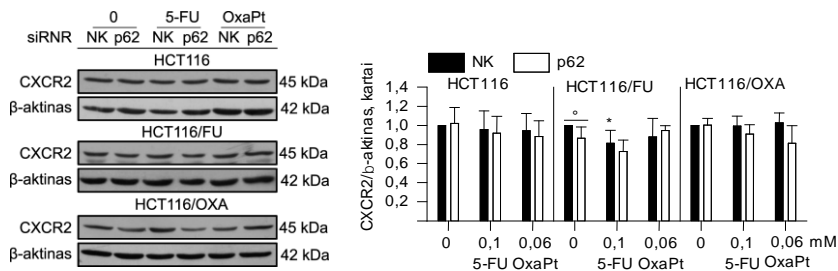
baltymas, todėl jo kiekį vertinome ląstelių auginimo terpėje. Pirmiausia nustatėme 0,1 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt poveikio reikšmę IL8 sekrecijai (3.20 pav.). Nustatėme, kad HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse 5-FU poveikis mažino IL8 kiekį – mediana mažėjo, atitinkamai, 1,9 ($p = 0,02$) ir 1,4 ($p = 0,049$) karto (geltonos ir žalios dėžutės). HCT116/OXA ląstelėse 5-FU poveikis IL8 sekreciją padidino 3,4 karto ($p < 0,001$) (raudona dėžutė). OxaPt poveikis HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse IL8 sekreciją didino, atitinkamai, 1,3 karto ($p = 0,02$) ir 1,7 karto ($p < 0,001$).



3.20 pav. IL8 kiekis terpėje po p62 raiškos tildymo HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. IL8 kiekis nustatytas praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po 0,1 mM 5-FU ar 0,06 mM OxaPt poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta viršutinė ir apatinė paklaidų riba, atitinkamai, 90-tas ir 10-tas procentiliai, dėžutė – IQR, linija – mediana, $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: veiktų ir neveiktų vaistais (*); NK ir p62 (°). °/*, kai $p \leq 0,05$; °°, kai $p \leq 0,01$; °°°/°°°, kai $p \leq 0,001$.

p62 raiškos tildymas lėmė IL8 kiekio sumažėjimą visose ląstelių linijose. Vaistais neveiktose HCT116 ląstelėse IL8 koncentracija sumažėjo 6 kartus ($p < 0,001$), po 5-FU poveikio – 1,8 karto ($p < 0,001$), o po OxaPt – 1,2 karto ($p = 0,009$) (3.20 pav. geltonas dėžutes lyginant su gelsvomis). Vaistais neveiktose HCT116/FU ląstelėse p62 tildymas IL8 kiekį sumažino 3,6 karto ($p < 0,001$), po 5-FU poveikio – 1,6 karto ($p = 0,002$), o po OxaPt poveikio pokyčių nenustatyta (3.20 pav. žalios dėžutes lyginant su žalsvomis). HCT116/OXA ląstelėse, neveiktose vaistais, IL8 kiekis po p62 raiškos tildymo sumažėjo 1,4 karto ($p < 0,001$), esant 5-FU poveikiui 1,4 karto ($p = 0,001$), o esant OxaPt – 1,7 karto ($p = 0,03$) (3.20 pav. raudonas dėžutes lyginant su rausvomis).

Kadangi p62 raiškos tildymas mažino IL8 receptorių koduojančio transkripto *CXCR2* transkriptų kiekį, tad toliau tyrėme, ar tai sumažina ir baltymo kiekį. Nustatėme, kad p62 raiškos tildymas jį sumažino 1,2 karto ($p = 0,02$) tik HCT116/FU kontrolinėse ląstelėse (3.21 pav. juodi stulpeliai lyginant su baltais). Vaistų poveikis neturėjo įtakos *CXCR2* baltymo kiekiui, išskyrus tuo atveju, kai HCT116/FU ląstelės buvo veiktos 0,1 mM 5-FU doze. *CXCR2* kiekis sumažėjo 1,2 karto ($p = 0,03$) (3.21 pav. juodi stulpeliai).



3.15 pav. CXCR2 kiekis po p62 raiškos tildymo HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. CXCR2 kiekis tirtas praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po 0,1 mM 5-FU ar 0,06 mM OxaPt poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkis + SD; $n \geq 3$. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp ląstelių: veiktų ir neveiktų vaistais (*); NK ir p62 (°). */°, kai $p \leq 0,05$.

Apibendrinant gautus rezultatus galime teigti, kad p62 raiškos tildymas mažino 1) citokinų transkriptų raišką HCT116 ląstelėse – *IL1A*, *IL6* ir *CXCR2*, HCT116/FU ir HCT116/OXA – *IL1A*, *CXCL8* ir *CXCR2*; 2) IL8 baltymo kiekį kontrolinėse ir 5-FU veiktose HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose, bei po OxaPt poveikio – HCT116 ir HCT116/OXA ląstelėse.

4. DISKUSIJA

Šiame darbe vertinome atsparumo chemoterapiniams vaistams 5-FU ir OxaPt molekulinis mechanizmus kolorektalinio vėžio (CRC) ląstelėse. Tyrėme citokinų, serpinų ir autofagijos baltymų kiekio pokyčius atsparumą chemoterapiniams vaistams įgijusiose CRC ląstelėse bei autofagijos reikšmę atsparumui. Eksperimentams naudojome atsparias sublinijas, kurios buvo išvestos mūsų laboratorijoje iš HCT116 ir SW620 ląstelių, jas ilgą laiką kultivuojant su 5-FU (HCT116/FU ir SW620/FU) arba OxaPt (HCT116/OXA ir SW620/OXA). Šie vaistai pasirinkti, nes iki šiol pavienis 5-FU poveikis arba jo kombinacija su OxaPt yra pagrindinis pažengusio CRC gydymo būdas. Pirmiausia įvertinome šiame darbe naudotų ląstelių atsparumo lygį. Gyvybingumo vertinimas po 5-FU ir OxaPt poveikio atskleidė, kad SW620 ląstelės yra atsparesnės vaistų poveikiui nei HCT116 ląstelių linija. Tai galima paaiškinti HCT116 ir SW620 ląstelėse esančiomis skirtingomis vėžio vystymąsi skatinančiomis mutacijomis. Nors abi ląstelių linijos turi mutavusį *KRAS* geną, tačiau tik SW620 ląstelėse yra mutavęs *TP53* (Ahmed *et al.*, 2013). Žinoma, kad mutavęs *TP53* yra susijęs su atsparumu chemoterapiniams vaistams CRC atveju (Li *et al.*, 2019). Išvestos sublinijos pasižymėjo skirtingu atsparumu vaistams. SW620/FU ir SW620/OXA sublinijų atsparumas 5-FU ir OxaPt poveikiui buvo mažesnis lyginant su sublinijomis, išvestomis iš HCT116 ląstelių. Be to, nors HCT116/FU, SW620/FU ir HCT116/OXA ląstelių atsparumas buvo indukuotas pavieniu vaisto poveikiu, tačiau šios sublinijos įgijo atsparumą abiem vaistams. Daugybiniis atsparumas yra dažnai stebimas vėžio atveju, kai ląstelės, veiktos pavieniu vaistu, tampa atsparios ir kitiems vaistams, veikiantiems skirtingais mechanizmais (Bukowski *et al.*, 2020).

Norėdami įvertinti pasirinktų molekulių kiekio pokyčius ir molekulinis veikimo mechanizmus chemoterapiniams vaistams atspariose CRC ląstelėse pasirinkome tris aspektus: 1) tyrėme molekulinis pokyčius, įvykusius atspariose sublinijose, lyginant su jautriomis; 2) vertinome 5-FU ir OxaPt įtaką autofagijos intensyvumui ir pasirinktų molekulių kiekiui; 3) nustatėme pasirinktų taikinių raiškos tildymo reikšmę ląstelių gyvybingumui.

Pirmiausia įvertinome, kaip atspariose HCT116/FU ir HCT116/OXA sublinijose, lyginant su HCT116, pasikeitė citokinų transkriptų raiška ir kaip ji keitėsi po 5-FU ir OxaPt poveikio. HCT116/FU ląstelėse padidėjo daugelio vėžio vystymąsi skatinančių citokinų raiška: *IL1A*, *IL6*, *IL32*, *CXCL3*, *CXCL4*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL10* ir *EGF*. Šiose ląstelėse pakito ir citokinų receptorių koduojančių transkriptų raiška: *CXCR1* ir *CXCR2* – padidėjo, o *CXCR4* – sumažėjo. HCT116/OXA ląstelėse citokinų raiška pasikeitė mažiau.

Šiose ląstelėse padidėjo *IL6*, *CXCL1*, *CXCL11*, *CXCR1* ir *CXCR4*, bet sumažėjo *IL7* ir *CXCR2* raiška. Žinoma, kad citokinai, reguliuodami apoptozę, NF-κB signalinį kelią, kitų citokinių raišką, autofagiją ar vaistus išnešančių nešiklių kiekį, dalyvauja susidarant įgytam atsparumui (1.2 lentelė). Parodyta, kad *IL6* ir *IL8* didina vaistus išnešančio nešiklio *ABCC1* kiekį (Shi *et al.*, 2012), kuris yra susijęs su 5-FU ir OxaPt indukuotu atsparumu CRC ląstelėse (Cao *et al.*, 2017). Parodyta, kad *IL8* gali reguliuoti NF-κB signalinį kelią, kuris yra susijęs su atsparumu 5-FU (Korber *et al.*, 2016), o 5-FU atspariose CRC ląstelėse *IL8* receptoriaus *CXCR2* blokavimas sumažina ląstelių gyvybingumą (Dabkeviciene *et al.*, 2015). Fosforilintas EGFR (Tyr1068), kurio kiekis yra padidėjęs HCT116/FU ir HCT116/OXA sublinijose (nepublikuoti duomenys), kitų autorių duomenimis yra siejamas su atsparumu 5-FU ir OxaPt (Qian *et al.*, 2019). Tai leidžia daryti prielaidą, kad citokinai ir jų receptoriai galėtų būti potencialūs atsparumą 5-FU ir OxaPt lemiantys veiksniai. Toliau tyrėme 5-FU ir OxaPt poveikį citokinių ir jų receptorių transkriptų raiškai. Iki šiol yra mažai duomenų apie citokinių raiškos pokyčius vėžinėse ląstelėse po chemoterapinių vaistų poveikio (Groysman *et al.*, 2021), dar mažiau yra žinoma apie jų raišką vaistams atspariose vėžinėse ląstelėse. Šiame darbe nustatėme, kad HCT116 ląstelėse tiek 5-FU, tiek OxaPt poveikis reikšmingai didino *IL1A*, *IL6*, *IL32*, *CXCL8*, *CXCR1*, *CXCR2* ir *CXCR4* raišką, o HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių atsakas priklausė nuo vaisto. HCT116/FU ląstelėse citokinių raiška labiau didėjo po OxaPt, o HCT116/OXA ląstelėse atvirkščiai – po 5-FU poveikio. Taigi, vaistas, kurį naudojant buvo išvesta tam tikra sublinija, nesukelia citokinių raiškos padidėjimo. Citokinių raiškos pokyčiai gali būti ląstelės atsakas į vaisto sukeltą stresą, prie kurio ji nėra prisitaikiusi. Taip pat, citokinių raiškos padidėjimas gali būti būdas ląstelėms apsisaugoti nuo vaistų sukulto citotoksiškumo. Žinoma, kad kai kurie citokinai skatina vaistų priešvėžines savybes, kai kurie priešingai – lemia vėžinių ląstelių proliferaciją, metastazes ir atsparumą. Po vaistų poveikio padidėjusi interleukinų ir chemokinių raiška dažniausiai skatina proliferaciją ir daro teigiamą poveikį vėžio progresijai (Groysman *et al.*, 2021).

Tirdami serpinų transkriptų raišką HCT116 ir SW620 ląstelėse bei jų sublinijose nustatėme, kad *SB5* kiekis padidėjo HCT116/FU ląstelėse ir sumažėjo SW620/FU, o 5-FU ir OxaPt poveikis didino jo kiekį visose ląstelėse, išskyrus HCT116/OXA subliniją, todėl toliau tyrėme jo baltymo kiekį. Nustatėme, kad HCT116/FU, HCT116/OXA ir SW620/OXA ląstelėse, lyginant su tėvinėmis linijomis, padidėjo citoplazmoje esančio *SB5* kiekis, o SW620/FU ląstelėse priešingai – sumažėjo. Duomenų apie *SB5* įtaką atsparumui nėra, tačiau žinoma, kad jo raiška yra padidėjusi CRC ląstelėse

lyginant su sveikomis (Chang *et al.*, 2018). Taip pat yra parodyta, kad ne tik SB5 kiekis, bet ir jo lokalizacija ląstelėje turi įtakos vėžio vystymuisi ir agresyvumui (Gurzu, Jung, 2021). SW620 ląstelėse ir jų sublinijose SB5 yra daugiau branduolyje nei citoplazmoje, o HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose atvirkščiai – jo yra daugiau citoplazmoje. Žinoma, kad SB5 lokalizacija CRC ląstelėse priklauso nuo mikrosatelitų būklės (Gurzu, Jung, 2021). MSS sporadinių kolorektalinių adenokarcinomų, tame tarpe ir SW620, SB5 branduolio raiška laikoma didelio agresyvumo, didelio pumpurų susidarymo laipsnio ir aukšto laipsnio dediferenciacijos rodikliu. MSI pasižyminčiose CRC ląstelėse, tame tarpe ir HCT116, SB5 kiekis yra didesnis citoplazmoje nei branduolyje (Gurzu, Jung, 2021). Toliau vertinome 5-FU ir OxaPt poveikį SB5 kiekiui. Šie vaistai padidino jo kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. HCT116/OXA ląstelėse SB5 kiekis padidėjo tik po 5-FU poveikio. SW620 ląstelėse ir jų sublinijose SB5 kiekį nustatėme ne tik citoplazmoje, bet ir branduolyje. Vaistų poveikis skirtingai veikė citoplazmoje ir branduolyje esančio SB5 kiekį. 5-FU ir OxaPt nežymiai, bet reikšmingai, padidino SB5 kiekį SW620 ir SW620/FU ląstelių citoplazmoje, o SW620/OXA ląstelėse jis didėjo tik po stipresnės OxaPt dozės. Taigi, 5-FU ir OxaPt skirtingai keitė SB5 kiekį skirtingose ląstelių linijose. Tai gali būti susiję su p53 baltymu, kuris indukuoja SB5 raišką (Lin *et al.*, 2019), o p53 koduojančio TP53 geno raiška yra indukuojama įvykus DNR pažeidimams, kurias sukelia 5-FU ar OxaPt poveikis (Cho *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2016). HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse TP53 genas yra laukinio tipo, o HCT116/OXA ląstelėse TP53 turi dvi mutacijas: Y236C DNR prijungimo domene, ir I255T p53 agregavimo regione (nepublikuoti duomenys). SW620 ląstelėse TP53 genas taip pat turi dvi mutacijas: R273H DNR prijungimo domene ir P309S lokalizacijos į branduolį sekoje (NLS) (Ahmed *et al.*, 2013). Dėl mutacijų, įvykusių DNR prijungimo domene, sumažėja p53 aktyvinamų genų raiška, tame tarpe ir SB5. Yra parodyta, kad skrandžio vėžio ląstelėse, turinčiose mutacijas TP53 geno DNR prijungimo domene, SB5 kiekis yra mažesnis nei ląstelėse, turinčiose laukinio tipo TP53 (Gurzu *et al.*, 2020). SW620 ląstelėse ir jų sublinijose, turinčiose mutavusį TP53, nežymiai padidėjusį SB5 kiekį po 5-FU ir OxaPt poveikio galėjo lemti ir kiti signaliniai keliai, indukuojantys SB5 raišką (Wongnoppavich *et al.*, 2017). SW620 ląstelių ir jų sublinijų branduolyje esančio SB5 kiekis po 5-FU ir OxaPt poveikio skyrėsi tarp ląstelių linijų ir taip pat priklausė nuo vaisto ar jo dozės. Žinoma, kad SB5 pernašą į branduolį aktyvina EGF-EGFR signalinis kelias (Longhi *et al.*, 2021). Mūsų tyrimai parodė, kad kitoje CRC ląstelių linijoje HCT116 ir jų sublinijose EGF ir EGFR transkriptų kiekis (3.3 pav.) bei EGFR aktyvumas (nepublikuoti duomenys) keitėsi skirtingai, priklausomai nuo ląstelių, vaisto ir jo dozės.

Galima manyti, kad vaistų poveikis, turėdamas skirtingą poveikį EGF ir EGFR kiekiui ar signalinio kelio aktyvumui, gali lemti ir skirtingą branduolyje esančio SB5 kiekį.

Toliau vertinome autofagijos pokyčius HCT116 ir SW620 ląstelėse bei jų sublinijose. Autofagosomų brendimui svarbių baltymų ATG7 ir ATG12 kiekis, lyginant su jautriomis, skyrėsi tarp atsparių sublinijų. ATG7 baltymo kiekis nežymiai, bet reikšmingai padidėjo HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse (Kukcinavičiūtė, 2019), o ATG12 baltymo kiekis padidėjo HCT116/OXA ląstelėse. SW620 ląstelių sublinijose ATG7 ir ATG12 kiekio pokyčių nenustatėme. ATG7 ir ATG12 dalyvauja autofagosomų susidaryme. ATG7 aktyvina ATG8 šeimos baltymus (įskaitant LC3) ir ATG12. Tai svarbu ATG8 šeimos baltymų kovalentiniam prijungimui prie PE, kuris įeina į autofaginių membranų sudėtį (Nakatogawa, 2020). CRC audiniuose, lyginant su sveiku audiniu, yra padidėjęs ATG5, ATG7, ATG12 kiekis (H. Liu *et al.*, 2022, Scherr *et al.*, 2020). Taip pat yra nustatyta, kad autofagija yra suaktyvėjusi ir kitose, įgytą atsparumą turinčiose vėžinėse ląstelėse. Gimdos kaklelio vėžio ląstelėse, atspariose paklitakseliui, padidėjo ATG7 ir ATG12-ATG5 konjugato kiekis (Peng *et al.*, 2014), cisplatinai atspariose plaučių vėžio (W. Li *et al.*, 2020) ir osteosarkomos (Jiang *et al.*, 2017) ląstelėse padidėjo ATG5 ir ATG7 kiekis. Krūties vėžio ląstelėse, atspariose 5-FU, docetakseliui arba doksorubicinui, padidėjo ATG5 kiekis (C. K. Das *et al.*, 2018), o vinkristinui atspariose skrandžio vėžio ląstelėse padidėjo ATG12 kiekis (An *et al.*, 2015).

Toliau vertinome autofagijos baltymo LC3B-II kiekį, kuris koreliuoja su autofagosomų skaičiumi (Nakatogawa, 2020). Lyginant su tėvinėmis linijomis autofagosomų kiekis atspariose sublinijose keitėsi skirtingai. Jų padaugėjo HCT116/FU ir SW620/OXA ląstelėse, o HCT116/OXA ir SW620/FU priešingai – sumažėjo. Kiti autoriai yra nustatę, kad CRC ląstelių sublinijose, atspariose 5-FU (Xian *et al.*, 2020) ar OxaPt (Huang *et al.*, 2018) poveikiui, autofagosomų kiekis yra padidėjęs. Autofagijos intensyvumą (srautą) vertinome pagal LC3B-II ir p62 kiekio pokyčius, kai skaidymas lizosomose yra sutrikdytas. LC3B-II įeina į autofagosomų membranų sudėtį ir dalis jo yra suskaidoma autolizosomose (Klionsky *et al.*, 2021), o p62 yra autofagijos substratas, kuris autofagijos metu kartu su savo kroviniu yra suskaidomas (Ueno, Komatsu, 2020). Autofagijos srautas (pagal LC3B-II) taip pat skyrėsi tarp sublinijų. Jis sumažėjo HCT116/OXA ląstelėse, bet padidėjo SW620/FU ir SW620/OXA sublinijose. Tai rodo, kad iš HCT116 ląstelių išvestose sublinijose skaidymo intensyvumas autofagosomose nepasikeitė arba nežymiai sumažėjo, o SW620 ląstelių sublinijose padidėjo.

Selektyvios autofagijos receptoriaus p62 kiekis, lyginant su tėvine linija, padidėjo HCT116/FU ląstelėse, o SW620/OXA ląstelėse padidėjo autofagijos srautas (pagal p62). Tai reiškia, kad SW620/OXA ląstelėse skaidymo greitis yra padidėjęs. Yra nustatyta, kad CRC sergančių pacientų vėžiniuose audiniuose p62 kiekis yra padidėjęs lyginant su sveiku audiniu ir yra siejamas su bloga gijimo prognoze (Ren *et al.*, 2014, J. Zhang *et al.*, 2019). Pagal kitų autorių duomenis p62 kiekis atspariose ląstelėse priklauso nuo vėžio tipo ar atsparumo konkrečiam vaistui. MDR pasižyminčiose kiaušidžių vėžio ląstelėse bei atsparumą OxaPt turinčiose CRC ląstelėse p62 kiekis yra sumažėjęs, o autofagijos srautas yra padidėjęs (Sun *et al.*, 2020, J. Wang *et al.*, 2018). Skrandžio vėžio ląstelėse, atspariose cisplatinai, p62 kiekis taip pat yra sumažėjęs lyginant su jautriomis ląstelėmis (Miao *et al.*, 2021). Padidėjęs p62 kiekis yra galvos ir kaklo vėžio ląstelėse, atspariose priešvėžiniam vaistui RITA (Shin *et al.*, 2017), OxaPt atspariose kepenų vėžio ląstelėse (Ma *et al.*, 2021) ir trigubą atsparumą turinčiose HEp-2 epitelio vėžio ląstelėse (Battista *et al.*, 2018).

4.1 lentelė. Autofagijos pokyčiai atspariose sublinijose lyginant su jautriomis.

Baltymas/Procesas	HCT116/FU	HCT116/OXA	SW620/FU	SW620/OXA
ATG7	↑*	↑*	-	-
ATG12	-	↑	-	-
LC3B-II	↑*	↓*	↓	↑
Srautas _{LC3B-II}	-*	↓*	↑	↑
p62	↑	-	-	-
Srautas _{p62}	-	-	-	↑

* palyginimui duomenys paimti iš E. Kukcinavičiūtė, 2019

Srautas – autofagijos srautas pagal LC3B-II ar p62 kiekio pokyčius esant ir nesant CQ.

↑ – kiekio/proceso didėjimas/aktyvinimas, ↓ – mažėjimas/slopinimas; - - pokytis statistiškai nereikšmingas.

Apibendrinant rezultatus galima teigti, kad HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelės skiriasi pagal autofagijos baltymų kiekį. HCT116/FU sublinijoje padidėjo ATG7, LC3B-II ir p62 kiekis, o HCT116/OXA ląstelėse padidėjo ATG7 ir ATG12 kiekis, o LC3B-II kiekis sumažėjo. Šiose sublinijose autofagijos srautas nežymiai sumažėjo arba nepasikeitė lyginant su tėvine linija. Tai rodo, kad galimai autofagosomos susidaro, bet skaidymas jose yra sutrikęs arba sulėtėjęs. Nepaisant to, kad SW620/FU ir SW620/OXA sublinijose, lyginant su SW620, nepasikeitė ATG7 ir ATG12 baltymų kiekis, tačiau išaugo autofagijos srautas, tai rodo, kad autofagija galėtų būti svarbi įgytam atsparumui šiose sublinijose.

Toliau vertinome, kaip autofagija keitėsi po 5-FU ir OxaPt poveikio. Nustatėme, kad HCT116 ir SW620 ląstelėse bei jų sublinijose vaistai

autofagiją veikė skirtingai (4.2 lentelė). HCT116 ląstelėse 5-FU ir OxaPt mažino ATG7, ATG12 ir p62 kiekį, bei autofagijos srautą (pagal LC3B-II). HCT116/FU ląstelėse abu vaistai taip pat sumažino ATG7, ATG12 kiekį, bei autofagijos srautą (pagal LC3B-II), o p62 kiekis mažėjo po OxaPt poveikio. HCT116/OXA ląstelėse šių vaistų įtaka autofagijai išsiskyrė. 5-FU poveikis mažino ATG7, ATG12 kiekį ir autofagijos srautą (pagal LC3B-II), o OxaPt priešingai – didino ATG7 kiekį ir autofagijos srautą (pagal LC3B-II ir p62). SW620 ląstelėse ir jų sublinijose autofagija priklausė nuo vaisto. Įdomu tai, kad šiose linijose 5-FU ir OxaPt mažino ATG7, bet didino ATG12 baltymo kiekį, o autofagijos srautas priklausė nuo vaisto. SW620 ir SW620/FU ląstelėse 5-FU autofagijos srautą (pagal LC3B-II) slopino, o OxaPt priešingai – aktyvino. SW620/OXA ląstelėse autofagijos srautas (pagal LC3B-II ir p62) mažėjo po abiejų vaistų poveikių.

4.2 lentelė. Autofagijos pokyčiai po 5-FU ir OxaPt poveikio.

Baltymas/Procesas	HCT116		HCT116/FU		HCT116/OXA	
	5-FU	OxaPt	5-FU	OxaPt	5-FU	OxaPt
ATG7*	↓	↓	↓	↓	↓ _{0,3}	↑
ATG12	↓	↓	↓	↓	↓	-
LC3B-II*	↓ _{0,1}	↓ _{0,03} , ↑ _{0,06}	↓	↓ _{0,03}	↑	↑ _{0,03} , ↓ _{0,06}
Srautas _{LC3B-II} *	↓	↓	↓	↓	↓	↑ _{0,06}
p62	↓	↓	-	↓	-	-
Srautas _{p62}	-	↑	-	-	-	↑ _{0,03}
Baltymas/ Procesas	SW620		SW620/FU		SW620/OXA	
ATG7	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ATG12	↑	↑ _{0,06}	↑ ₁	↑ _{0,06}	↑ ₁	↑ _{0,06}
LC3B-II	↑ ₁	-	↑ ₁	-	-	-
Srautas _{LC3B-II}	↓ ₁	↑	↓ ₁	↑	↓	↓ _{0,03}
p62	-	-	-	↓ _{0,06}	-	-
Srautas _{p62}	-	-	-	-	↓	↓

* palyginimui duomenys paimti iš E. Kukcinavičiūtė, 2019

Srautas – autofagijos srautas pagal LC3-II ar p62 kiekio pokyčius esant ir nesant CQ.

↑ – kiekio/proceso didėjimas/aktyvinimas, ↓ – mažėjimas/slopinimas; - – pokytis statistiškai nereikšmingas. Prie rodyklių nurodytos vaistų koncentracijos (mM), kurioms esant baltymų kiekio pokytis buvo statistiškai reikšmingas.

Autofagiją slopinantis 5-FU poveikis buvo nustatytas ir kitose CRC ląstelėse – SNUC5, o 5-FU atsparioje SNUC5 ląstelių sublinijoje autofagijos intensyvumas sumažėjęs lyginant su jautriomis (Yao *et al.*, 2017). OxaPt poveikis autofagijos srautui priklausė nuo ląstelių tipo ir dozės. Autofagijos aktyvinimas esant OxaPt poveikiui CRC ląstelėse yra siejamas su atsparumu (Sun *et al.*, 2020), tačiau yra duomenų, rodančių OxaPt neigiamą įtaką autofagijai šio tipo vėžinėse ląstelėse (Boo *et al.*, 2022). Autofagosomų

biogenezėje dalyvaujančių molekulių raiškos skirtumus galėjo lemti ląstelių molekuliniai pokyčiai, skirtingas vaistų veikimo mechanizmas, bei sudėtinga šių molekulių raiškos reguliacija. Yra parodyta, kad nesmulkiają ląstelinės plaučių karcinomos ląstelėse cisplatina mažina ATG5, ATG7 ir Beclin-1 baltymų kiekį ir autofagijos baltymų raišką reguliuojančio transkripcijos faktoriaus MiTF kiekį (W. Li *et al.*, 2020). Yra žinoma, kad ATG7 ir ATG12 raiška gali būti reguliuojama transkripcijos metu ir po jos. Pavyzdžiui, ATG7 raiška karboplatina veiktose krūties vėžio ląstelėse yra reguliuojama transkripcijos faktoriaus HSF1 (Desai *et al.*, 2013). ATG12 raiška kiaušidžių karcinomos ląstelėse priklauso nuo transkripcijos faktoriaus NRF2 (Bao *et al.*, 2014), o kasos vėžio ląstelėse – nuo iRNR splaisingo baltymo PTBP3, kuris lemia atsparumą gemcitabinui (Ma *et al.*, 2020). ATG7 ir ATG12 raišką gali reguliuoti ir miRNR, be to, kai kurios miRNR yra susijusios su atsparumu chemoterapiniams vaistams. HCT116 ir SW620 ląstelėse ATG7 kiekį mažina miR-106a (Hao *et al.*, 2017), kepenų karcinomos ląstelėse – miR-199a-5p (Xu *et al.*, 2012). Skrandžio vėžio ląstelėse ATG12 yra miR-23b-3p taikiny (An *et al.*, 2015), docetakseliui jautriose ir atspariose plaučių adenokarcinomos ląstelėse – miR-200b (Pan *et al.*, 2015), deksametazonui atspariose dauginės mielomos ląstelėse – miR-221/222 (Xu *et al.*, 2019).

Vaistų įtaka p62 baltymo kiekiui skyrėsi priklausomai nuo ląstelių linijos. 5-FU ir OxaPt mažino p62 kiekį HCT116 ląstelėse, o SW620 ląstelėse nekeitė. Šie vaistai jį sumažino ir DLD1 ląstelėse (Zitkute *et al.*, 2023), kurios, kaip ir HCT116 linija, pasižymi MSI ir CIMP bei jų KRAS ir PIK3CA genuose yra įvykusios mutacijos. Šie rezultatai sutampa ir su kitų tyrimų duomenimis, kai 5-FU ir OxaPt mažino p62 kiekį CRC ląstelėse (He *et al.*, 2020, B. Kumar *et al.*, 2021). Šiame darbe nustatėme, kad OxaPt poveikis mažino p62 kiekį ir HCT116/FU ląstelėse, kurios pasižymi nedideliu atsparumu šiam vaistui, ir SW620/FU sublinijoje, kurios neįgijo atsparumo OxaPt poveikiui. DLD1/FU ląstelėse, kurios nėra atsparios OxaPt poveikiui, šis poveikis taip pat sumažino p62 kiekį (Zitkute *et al.*, 2023). Apibendrinant gautus rezultatus galime teigti, kad p62 kiekis nekito ląstelių sublinijose, turinčiose atsparumą konkrečiam vaistui. Tai parodo, kad p62 raiškos mažėjimas yra susijęs su jautrumu 5-FU ar OxaPt poveikiui.

Nemažai tyrimų rodo, kad autofagijos farmakologinis ar genetinis slopinimas didina ląstelių jautrumą chemoterapiniams vaistams (Zamame Ramirez *et al.*, 2021), todėl šiame darbe nustatėme autofagijos reikšmę atsparumui HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Ją vertinome mažindami autofagijoje dalyvaujančių molekulių ATG5, ATG7, ATG12 ir p62 kiekį ir matuodami ląstelių gyvybingumą dviem metodais: ląsteles dažant kristaliniu violetiniu (KV) ir matuojant mitochondrijų oksidoreduktazių aktyvumą MTT

metodu (toliau metabolinis aktyvumas). Kadangi OxaPt kai kuriais atvejais didina autofagijos intensyvumą (5-FU poveikis jį mažino), šiame darbe mažindami autofagosomų biogenezei svarbių baltymų ATG5, ATG7 ir ATG12 kiekį, tyrėme autofagijos reikšmę atsparumui OxaPt. Nustatėme, kad ATG5 raiškos tildymas sumažino vaistais neveiktų HCT116/FU ląstelių gyvybingumą, o ATG7 – HCT116 ir HCT116/OXA. Šiuo metu yra žinoma, kad ATG5 yra svarbus cisplatinai atsparių plaučių vėžio ląstelių (W. Li *et al.*, 2020) ir krūties vėžio ląstelių, atsparių epirubicinui (Chittaranjan *et al.*, 2014) ar doksorubicinui (C. K. Das *et al.*, 2018) išgyvenimui ir atsparumui. Taip pat yra nustatyta, kad ATG7 kiekio sumažinimas reikšmingai mažina epirubicinui atsparių krūties vėžio ląstelių (Chittaranjan *et al.*, 2014), paklitakseliui atsparių gimdos kaklelio vėžio (Peng *et al.*, 2014) ir 5-FU atsparių CRC ląstelių (Li *et al.*, 2010) gyvybingumą. Šiame darbe taip pat nustatėme, kad ATG12 raiškos tildymas sumažino vaistais neveiktų HCT116 ląstelių ir jų sublinijų gyvybingumą, bei padidino HCT116 ir HCT116/FU ląstelių jautrumą OxaPt poveikiui. Panašiai kaip ir KV atveju, ATG12 raiškos tildymas mažino HCT116 ir HCT116/FU ląstelių metabolinį aktyvumą. Kiti mokslininkai parodė, kad ATG12 yra svarbus ir kitų vėžio tipų atsparumui vaistams, tame tarpe plaučių vėžio ląstelėms, atsparioms docetakseliui (Pan *et al.*, 2015), bei skrandžio vėžio ląstelėms, atsparioms 5-FU, vikristinui ir cisplatinai (An *et al.*, 2015).

p62 raiškos tildymas sumažino prie augimo paviršiaus prikibusių ląstelių skaičių (KV), tačiau padidino atsparių sublinijų metabolinį aktyvumą (MTT). Žinoma, kad ląstelėse MTT gali būti redukuojamas oksidoreduktazių, dehidrogenazių ir elektronų donorų (dažniausiai NAD(P)H) (Ghasemi *et al.*, 2021). Šie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad atspariose sublinijose p62 yra svarbus reguliuojant oksidacijos-redukcijos reakcijų pusiausvyrą, o jo raiškos tildymas sumažina ląstelių skaičių, bet padidina redukcinį aktyvumą. Taigi, atspariose sublinijose p62 skatina ląstelių išgyvenimą, bet slopina redukcinį pajėgumą, o jautriose – skatina išgyvenimą. Šie duomenys rodo, kad atspariose sublinijose, lyginant su jautriomis, yra pasikeitęs metabolizmas. Kitų tyrimų metu nustatyta, kad metabolinis perprogramavimas yra vienas iš atsparumo chemoterapiniams vaistams bruožų (Chen *et al.*, 2020).

p62 svarba ląstelių išgyvenimui paskatino išanalizuoti, kokie molekuliniai veiksniai, per p62 reguliuojantys ląstelių žūtį ir išgyvenimą, galėtų būti reikšmingi atsparumui. Po p62 raiškos tildymo vertinome su p62 tiesiogiai sąveikaujančio RIPK1 kiekį. Žinoma, kad RIPK1 gali būti aktyvinamas įvairių signalų, kuriuos indukuoja stresą sukeltantys veiksniai ar imuninių receptorių TLR ar TNFR aktyvavimas. Šie signaliniai keliai reguliuoja išgyvenimo, žūties ir uždegimo genų raišką (Newton, 2020). RIPK1 gali veikti

dviem būdais – kaip struktūrinis komponentas, apsaugantis ląstelę nuo žūties, arba veikti kaip kinazė, kuri priešingai – indukuoja žūtį (Delanghe *et al.*, 2020). RIPK1 kaip struktūrinis komponentas gali aktyvinti NF- κ B arba MAPK signalinius kelius, kurių aktyvinimas lemia įvairių uždegiminių ir išgyvenimą skatinančių genų raišką. RIPK1 kaip struktūrinis komponentas taip pat gali apsaugoti ląstelę nuo apoptozės ar nekrotozės. Tačiau RIPK1, veikdamas kaip kinazė, priklausomai nuo sąlygų, gali inicijuoti apoptozę ar nekrotozę (Delanghe *et al.*, 2020, Newton, 2020). p62 raiškos tildymas sumažino RIPK1 kiekį kontrolinėse bei 5-FU ir OxaPt veiktose HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Įdomu tai, kad vaistai mažino RIPK1 kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse, o HCT116/OXA ląstelėse priešingai – didino. Tai leidžia manyti, kad RIPK1 atlieka skirtingas funkcijas atspariose sublinijose. Žinoma, kad RIPK1 gali sąveikauti su RIPK3 ir indukuoti jo auto ir transfosforilinimą (Karlowitz, van Wijk, 2023), o aktyvintas RIPK3 gali indukuoti nekrotozę arba apoptozę (Tummers, Green, 2022), nors mūsų ląstelėse RIPK3 slopinimas inhibitoriumi GSK843 nepakeitė ląstelių atsako į 5-FU ir OxaPt poveikį (Zitkute *et al.*, 2023). Toliau vertinome p62 raiškos tildymo įtaką nekrotozei svarbaus fosforilinto RIPK3 (Ser227) (pRIPK3) kiekiui. pRIPK3 kiekis po p62 raiškos tildymo mažėjo HCT116/FU ląstelėse po 5-FU poveikio ir HCT116/OXA ląstelėse po OxaPt poveikio. Tai rodo šios molekulės dalyvavimą procesuose, susijusiuose su šių ląstelių atsparumu 5-FU ir OxaPt. Taip pat įvertinome p62 reikšmę kaspazės-3 aktyvumui ir apoptozei. p62 raiškos tildymas HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse sumažino kaspazės-3 aktyvumą bei nekeitė žuvusių ląstelių kiekio. Tai sutapo su kitų mokslininkų gautais rezultatais, kai kaspazių-3, 8 ir 9 aktyvumas mažėjo po p62 raiškos tildymo (Huang *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2013). RIPK1 gali būti siejamas ne tik su nekrotoze, bet ir su ląstelių išgyvenimu. Nustatyta, kad pažeidus DNR CRC ląstelėse vyksta RIPK1 ubikvitilinimas, o tai aktyvina NF- κ B signalinį kelią ir lemia vėžinių ląstelių išgyvenimą ir proliferaciją (Sheng *et al.*, 2017). Tyrimai parodė, kad RIPK1 ir RIPK3 raiškos padidėjimas gali skatinti CRC ląstelių proliferaciją, išgyvenimą ir citokinų raišką (Z. Y. Liu *et al.*, 2019, Zeng *et al.*, 2018). Taip pat yra duomenų, rodančių, kad RIPK1 ir RIPK3 kiekis yra sumažėjęs CRC ląstelėse, lyginant su sveiku audiniu, ir tai lemia CRC tolimesnį vystymąsi (Bozec *et al.*, 2016, Moriwaki *et al.*, 2015). Šiuo metu žinių apie RIPK1 ir RIPK3 įtaką CRC ląstelių atsparumui nėra, tačiau žinoma, kad RIPK3 kiekio sumažėjimas lemia atsparumą cisplatinai gerklų plokščialąstelinės karcinomos ląstelėse (Sun *et al.*, 2018).

Kadangi p62 raiškos tildymas nesukėlė žūties po vaistų poveikio, todėl liko neaišku, kodėl ląstelių gyvybingumas po p62 raiškos tildymo mažėjo. Tai

paskatino įvertinti p62 įtaką išgyvenimą skatinančių citokinių kiekiui. Šiame darbe nustatėme, kad p62 raiškos tildymas mažino *CXCL8* transkripto ir jo koduojamo IL8 baltymo kiekį. Žinoma, kad *CXCL8* geno raiška yra reguliuojama NF-κB (Park, Hong, 2016). Tyrimai parodė, kad p62 gali tiesiogiai per savo TB domeną arba per RIPK1 aktyvinti NF-κB signalinį kelią ir taip indukuoti *CXCL8* raišką (Kumar *et al.*, 2022).

Taigi, remiantis mūsų duomenimis galime teigti, kad 5-FU sukeltas atsparumas, lyginant su OxaPt, padidina didesnės dalies citokinių transkriptų kiekį. Atspariose CRC ląstelių sublinijose didėja serpino B5 baltymo kiekis, o 5-FU ir OxaPt jo kiekį didina tėvinėse ląstelėse ir sublinijose, išvestose kultivuojant su 5-FU. Nustatėme, kad CRC ląsteles ir jų atsparias sublinijas paveikus 5-FU ar OxaPt ATG7 ir ATG12 baltymų kiekis ir autofagijos intensyvumas priklauso nuo linijos. Be to, ATG12 yra svarbus HCT116 ląstelių ir jų sublinijų išgyvenimui bei HCT116 ir HCT116/FU ląstelių atsparumui OxaPt. Baltymo p62 kiekis yra padidėjęs HCT116/FU ląstelėse. p62 yra svarbus HCT116 ląstelių ir vaistams atsparių sublinijų išgyvenimui bei atsparumui 5-FU ir OxaPt, nes skatina citokinių raišką.

IŠVADOS

- HCT116/FU ląstelėse citokinų transkriptų kiekis yra padidėjęs labiau nei HCT116/OXA sublinijoje, o 5-FU ir OxaPt didina citokinų transkriptų kiekį ląstelėse, neprisitaikiusiose prie vaisto poveikio;
- Atspariose CRC ląstelėse serpino B5 kiekis padidėja, o 5-FU ir OxaPt jį didina HCT116 ir SW620 ląstelėse ir jų sublinijose, išvestose su 5-FU;
- ATG12 kiekis yra padidėjęs HCT116/OXA ląstelėse, o 5-FU ir OxaPt poveikis jo kiekį mažina HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose, bet didina SW620 ląstelėse ir jų sublinijose;
- ATG12 yra svarbus HCT116 ląstelių ir jų sublinijų išgyvenimui, o jo raiškos tildymas didina HCT116 ir HCT116/FU ląstelių jautrumą OxaPt;
- p62 kiekis yra padidėjęs HCT116/FU ląstelėse, o jo kiekio mažėjimas po 5-FU ir OxaPt poveikio koreliuoja su jautrumu vaistams CRC ląstelėse ir jų atspariose sublinijose;
- p62 reguliuoja IL8 raišką bei skatina HCT116 ląstelių ir jų sublinijų išgyvenimą bei atsparumą 5-FU ir OxaPt.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

LIST OF ABBREVIATIONS

5-FU	5-fluorouracil
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomal instability
CRC	Colorectal cancer
CQ	Chloroquine
CMS	Consensus molecular subtype
CTT	Cytotoxicity level, i.e., percentage of dead cells
CV	Cell viability measurement method with crystal violet
FC	Flow cytometry
HC	Cell counting with a hemacytometer
IC ₅₀	Concentration of the drug that kills 50 % of cells
LC3B-I	Cytoplasmic form of LC3B
LC3B-II	Lipidated form of LC3B associated with the membrane of autophagosomes
MDR	Multidrug resistance
MSI/MSS	Microsatellite instability/stability
MTT	Cell viability measurement method with MTT reagent
NT	Negative control – cells treated with a mix of human transcripts non-targeting siRNAs
OxaPt	Oxaliplatin
qPCR	Quantitative PCR
RI	Resistance index, ratio of drug-resistant to sensitive cells IC ₅₀
ROS	Reactive oxygen species
SB1/B5/E1/E2	Serpins B1/B5/E1/E2
SDS	Sodium dodecyl sulphate
siRNA	Small interfering RNA
<i>SQSTM1</i>	Gene or transcript encoding p62 protein
WB	Western blot method

INTRODUCTION

According to the World Health Organisation's latest data, colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancers worldwide. It ranks third in incidence and second in deaths from cancer (Sung *et al.*, 2021). One of the reasons for this high mortality is late diagnosis, when CRC is at an advanced stage and treatment options are limited. The most common treatment for advanced CRC is chemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) or its combination with oxaliplatin (OxaPt) and leucovorin (folinic acid) (Hossain *et al.*, 2022). Another reason for the high mortality of CRC patients is resistance to chemotherapy drugs. Cancer cells may be resistant before treatment (innate) or may develop resistance during treatment (acquired). 5-FU and OxaPt act by different mechanisms (Very *et al.*, 2018) and therefore have different mechanisms of resistance (Marin *et al.*, 2020). Main mechanisms of resistance include intracellular drug concentration reduction, DNA damage repair system and survival signalling pathways activation, programmed cell death inhibition, drug neutralization or changes in the targets (Liu *et al.*, 2021). Understanding the molecular mechanisms of resistance to chemotherapeutic drugs remains an important area of research to identify precise targets and discover drugs that improve cancer treatment outcomes.

Inflammatory processes play an important role in the development of CRC and may also play a role in the development of resistance. One of the most recently discovered mechanisms of resistance to chemotherapeutic drugs is the changes in the tumour cell secretome (TCS), i.e. a set of molecules secreted by cancer cells that promote the development of cancer. Chemotherapeutic drugs can alter TCS and thus promote resistance (Madden *et al.*, 2020). Cytokines are part of the TCS, but little is known about their impact on chemoresistance to chemotherapy. Cytokines are small signalling molecules that regulate inflammation and homeostasis, and in paracrine and autocrine ways regulate cancer cell survival, proliferation, migration, angiogenesis, and other processes that are important for cancer progression (Borowczak *et al.*, 2022, Propper, Balkwill, 2022).

Serpins have recently become a focus of attention for many researchers because a number of serpins are involved in tumour formation, from angiogenesis to tumour growth and progression (Sanrattana *et al.*, 2019). Serpins are serine protease inhibitors that regulate angiogenesis, inflammation, extracellular matrix remodelling, programmed cell death and cell development, and changes in their expression are associated with tumour progression (Mkaouar *et al.*, 2019). The impact of serpins on CRC progression is unclear, some serpins may inhibit, and others may activate the development

or metastasis (Paczek, Mroczo, 2022). Although knowledge about the impact of serpins on cancer development is increasing, there are few data on changes in serpin levels in chemoresistant cancer cells or on their effect on resistance.

Autophagy in cancer cells can play a dual role in inhibiting their development or, conversely, preventing unfavourable conditions (Lim *et al.*, 2021). In the early stages of cancer development, before the cell becomes cancerous, autophagy inhibits the development of cancer, while once the cells are malignant, autophagy protects against unfavourable growth conditions, such as deprivation of food, oxygen, energy or increased levels of reactive oxygen species (ROS) (Chavez-Dominguez *et al.*, 2020). CRC cells are known to have an increased intensity of autophagy compared to healthy cells (H. Wang *et al.*, 2021). Fundamental research and clinical trials suggest that pharmacological or molecular blocking of autophagy can be used to improve the anti-cancer efficacy of chemotherapeutic drugs (Zamame Ramirez *et al.*, 2021), but there is a lack of knowledge about its impact on chemotherapeutic drug-induced resistance.

CRC tissues show increased levels of the selective autophagy receptor p62 compared to healthy tissues, and this protein is associated with cancer cell aggressiveness (Tang *et al.*, 2021) and poor prognosis of patients with cancer (J. Zhang *et al.*, 2019). p62, due to its multidomain structure, can regulate a wide range of processes: cell death, survival, inflammation, oxidative stress, and tumour development (Hennig *et al.*, 2021, Kumar *et al.*, 2022). Although there is growing evidence of changes in p62 levels in resistant cells and effects on resistance but the exact mechanism underlying resistance is still not clear.

The study goal of the dissertation work was to investigate the levels of cytokine, serpin, and autophagy proteins in chemoresistant colorectal carcinoma cells and to determine the role of autophagy in resistance.

Towards this goal, the following specific tasks have been formulated:

- To compare the levels of cytokine, serpin, autophagy proteins and intensity of autophagy in drug-sensitive and resistant colorectal cancer cells;
- To assess changes in cytokine, serpin, autophagy protein levels and autophagy intensity after exposure to 5-FU and OxaPt in drug-sensitive and resistant colorectal cancer cells;
- To determine the role of autophagy in resistance in HCT116 cells and their resistant sublines.

SCIENTIFIC NOVELTY

In this study, we compared the expression of cytokine transcripts in CRC cells with different levels of resistance to chemotherapeutic agents. We found that HCT116/FU cells were characterised by altered transcriptional expression of approximately half of the cytokines and their receptors tested (14 out of 27). In HCT116/OXA cells, however, we detected transcriptional changes in only a quarter of the cytokines tested compared to the parental line. Knowledge of the role of cytokines in chemotherapeutic drug-induced resistance in CRC is limited. IL1 β has been shown to increase the resistance of CRC cells, including HCT116, to 5-FU (Spagnardi *et al.*, 2022). Other authors have shown that doxorubicin-resistant HCT116 cells have elevated levels of IL8 and IL10, and IL8 depletion makes cells more sensitive to the drug (Du *et al.*, 2018). In addition, it is established that IL17 determines the resistance of HCT116 cells to cisplatin (Sui *et al.*, 2019). In this work, we also identified changes in cytokine expression in HCT116 cells and their sublines after exposure to 5-FU and OxaPt. Interestingly, 5-FU and OxaPt significantly increased cytokine expression in sensitive cell line, whereas OxaPt significantly increased cytokine expression in HCT116/FU cells, while 5-FU significantly increased it in HCT116/OXA cells.

We were the first to show changes in the levels of serine protease inhibitors (serpins) in chemoresistant CRC cells. We found that HCT116/FU, HCT116/OXA and SW620/OXA cells showed an increase in SB5 compared to sensitive cells, while SW620/FU cells showed a decrease. We also found that exposure to 5-FU and OxaPt increased the cytoplasmic SB5 levels in HCT116, HCT116/FU, SW620 and SW620/FU cells. In HCT116/OXA cells, SB5 levels increased only after 5-FU, whereas in SW620/OXA cells increased after OxaPt treatment. In SW620 cells and their sublines, where a major part of SB5 is localised in the nucleus, the amount of SB5 in the nucleus depends on the cell line, drug, and its dose. 5-FU and OxaPt also increase the expression of serpin transcripts *SB1*, *SE1*, and *SE2* and their changes depend on cell line and drug exposure. Studies by other researchers have shown that cisplatin-resistant ovarian cancer cells have increased SE1 and SE2 protein levels (Pan *et al.*, 2017) and in paclitaxel-resistant breast cancer cells SB3 and SB4 are upregulated (Pavlikova *et al.*, 2014).

Although there is a growing amount of evidence demonstrating the importance of autophagy for acquired chemotherapeutic drug resistance in various cancers, including CRC, the molecular mechanisms of action are poorly understood. In this work we were the first to find that in HCT116/FU

cells, compared to HCT116, ATG12 protein levels are increased. We also showed that silencing of *ATG12* expression reduces the viability of HCT116 cells and their sublines and increases the sensitivity of HCT116 and HCT116/FU cells to OxaPt. Currently there are only a few known cases in which inhibition of autophagy enhances the sensitivity to drugs of resistant CRC cells. Autophagy inhibition by 3-methyladenine and silencing of *ATG7* expression in 5-FU-resistant DLD1 cells makes cells more sensitive 5-FU (Li *et al.*, 2010). Also, in 5-FU-resistant HCT8 cells the autophagy inhibitor chloroquine (CQ) increases the sensitivity of cells to this drug (M. Wang *et al.*, 2018). In addition, it has been shown that treatment with CQ increases the drug sensitivity of OxaPt-resistant HCT116 cells (H. Wang *et al.*, 2021).

Although the selective autophagy receptor p62 has been extensively studied in the context of cancer, there is little data on its role in resistance. In this work, we focused on changes in p62 expression in chemotherapeutic drug resistant CRC cells and evaluated its role in 5-FU and OxaPt-induced resistance. We found that HCT116/FU cells have increased levels of p62 protein compared to the parental line. There is evidence that p62 levels in resistant cells depends on the type of cancer or resistance. Ovarian cancer and osteosarcoma cells with multidrug resistance (MDR) have lower levels of p62 compared to sensitive lines (J. Wang *et al.*, 2018), while in HEP-2 carcinoma cells with MDR, including 5-FU, p62 expression is increased compared to the sensitive line (Battista *et al.*, 2018). In this work, we were the first to show that silencing of p62 expression reduces the viability of resistant HCT116/FU and HCT116/OXA cells but increases their metabolic activity. We also found that the decrease in viability of HCT116 cells and their sublines after silencing of p62 expression is not due to its effect on cell death, but to a reduction in survival-promoting molecules (e.g. IL8).

STATEMENTS TO BE DEFENDED

- 5-FU-induced resistance in HCT116 cells increases cytokine transcript levels more than OxaPt-induced resistance, while 5-FU and OxaPt increase their expression in cells not adapted to exposure.
- Serpin B5 levels increase in resistant CRC cells, while 5-FU and OxaPt increase its levels in parental lines and sublines with 5-FU-induced resistance.
- ATG12 levels are elevated in HCT116/OXA cells, and the effect of 5-FU and OxaPt on ATG12 levels is cell line dependent.
- ATG12 is important for the survival of HCT116 cells and their sublines, and for the resistance of HCT116 and HCT116/FU cells to OxaPt.
- p62 levels are elevated in HCT116/FU cells and the decrease in p62 levels after 5-FU and OxaPt exposure correlates with drug sensitivity.
- p62 promotes survival and resistance to 5-FU and OxaPt of HCT116 cells and their sublines.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. Human colorectal carcinoma cell line HCT116 (CCL-247, ATCC) and colorectal adenocarcinoma cell line SW620 (CCL-227, ATCC) were used for the study. The chemoresistant sublines HCT116/FU, SW620/FU or HCT116/OXA, SW620/OXA were generated in our laboratory by prolonged cultivation with medium containing 5-FU or OxaPt. 5-FU concentration was increased from 10 μ M to 20 μ M for HCT116/FU cells and from 5 μ M to 50 μ M for SW620/FU cells. OxaPt concentration was increased from 1 μ M to 20 μ M for HCT116/OXA cells and from 5 μ M to 50 μ M for SW620/OXA cells. HCT116 cells and their sublines were cultivated in RPMI 1640 medium and SW620 cells and their sublines were cultivated in DMEM medium. All cells were grown in a humidified atmosphere at 37 °C in 5 % CO₂. Cell growth media were supplemented with 10 % FBS (Cegrogen biotech), GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) and penicillin-streptomycin solution (Thermo Fisher Scientific).

Drugs and inhibitors. Anticancer drugs 5-FU (50 mg/mL, Accord Healthcare) and OxaPt (5 mg/mL, Accord Healthcare) were used for the study. Autophagy inhibitor chloroquine (CQ; Sigma-Aldrich) was diluted in ddH₂O (10 mg/mL) and 30 μ M of CQ was used for experiments.

Schedule of drug exposure. Cells were seeded at different densities for comparison mechanisms of 5-FU and OxaPt resistance because of the different of the growth rates. HCT116 cells were seeded at 1×10^5 cells/mL, HCT116/OXA, SW620, SW620/FU – 1.5×10^5 cells/mL and HCT116/FU, SW620/OXA – 2×10^5 cells/mL. 5-FU or OxaPt was added to the culture medium 48 h after cell seeding. Cells were incubated with the drugs for 24 h for quantitative polymerase chain reaction (qPCR_D), and 48 h for western blot (WB) or viability assay using crystal violet dye (CV). CQ was used to determine autophagic flux and was added to the culture medium at 4 h before cell lysis. Changes in the levels of cytokine and serpin transcripts in chemoresistant sublines were determined at 92 h after cell seeding (qPCR_C). For serpin B5 localisation, cells were fractionated at 92 h after seeding (REAP). The principal scheme of drug exposure is presented in Fig. 1.

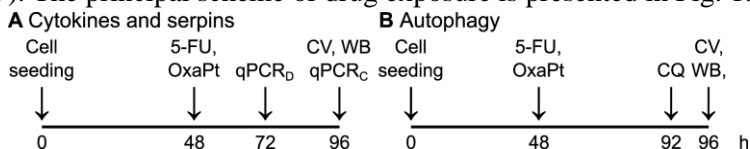


Fig. 1. Schedule of experiments to assess the effects of 5-FU and OxaPt on levels of cytokines and serpins (A) and autophagy protein levels (B).

siRNA transfection. For transfection experiments, HCT116 cells were seeded at a density of 1×10^5 cells/mL, HCT116/FU and HCT116/OXA sublines – 1.5×10^5 cells/mL in an antibiotic-free medium. Transfection was performed 24 h after cell seeding. siRNA and transfection reagent “Lipofectamine RNAiMAX™” (Thermo Fisher Scientific) were gently mixed with “Opti-MEM™” medium (Thermo Fisher Scientific) and incubated for 20 min at room temperature. The transfection mixture was added dropwise on cells after incubation. Transfection conditions are shown in Table 1.

Table 1. Transfection conditions for one well.

Reagents (μL)	Number of wells in a plate			
	48	24	12	6
Opti-MEM™ medium	40	100	100	200
siRNA (10 μM)	0,134	0,29	0,5	1,25
Lipofectamine RNAiMAX™	0,4	1,76	3	7,5
20 min of incubation				
The total volume of medium in the well	180	380	720	1850
The final volume in the well	220	480	820	2050
Final siRNA concentration in the well	6 nM			

Gene-specific siRNAs targeting ATG5 (CAUCUGAGCUACCCG GAUAtt, 4390827, Ambion), ATG7 (CCAACACACUCGAGUCUUUtt, 4390827, Ambion) ATG12 (GCAGUAGAGCGAACACGAAtt, 4457298, Ambion) or p62 (TCGGAGGATCCGAGTGTGAAT, SI03116750, Qiagen) were used. For negative control, non-targeting “AllStars” siRNA (1027280, Qiagen) was used.

After 24 h medium was replaced with fresh fully supplemented medium and 5-FU or OxaPt was added. For ATG5, ATG7 and ATG12, the silencing efficiency was determined 24 h after transfection at the transcript level (qPCR_{ATG}) and for p62 – 48 h after transfection at protein levels (WB_{p62}). The effects of p62 silencing on the levels of transcripts were determined at 24 h after drug treatment. The effects of p62 silencing on cell viability (CV, MTT assays), number of cells (HC), apoptosis (FC), autophagic flux, and protein expression levels (WB, ELISA) were determined at 48 h after drug treatment. CQ was added to the medium 4 h before cell lysis. The principal scheme of transfection is presented in Fig. 2.

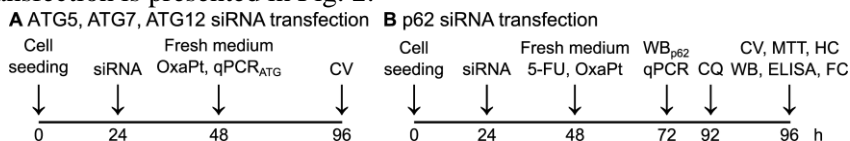


Fig. 2. Schedule of ATG5, ATG7, ATG12 (A) and p62 (B) siRNA transfection.

Quantitative PCR (qPCR). Total RNA was isolated using the “GeneJET RNA Purification Kit” (Thermo Fisher Scientific). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1-3 µg of RNA sample using the “Maxima™ H Minus cDNA Synthesis Master Mix kit” (Thermo Fisher Scientific). qPCR reactions were performed using 50 ng of cDNA, “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)” (Thermo Fisher Scientific) and specific primers (2 suppl. 1 table) on the “StepOnePlus™ Real-Time PCR System” (Applied Biosystems). The mRNA expression levels were normalized to endogenous control genes *TBP* and/or *HPRT*. Threshold cycle values (C_t) were determined from three independently isolated RNA samples and performed in duplicates. “Comparative C_t method” ($\Delta\Delta C_t$ method) was used for the analysis of results. Changes in expression were considered significant when the transcript levels changed at least twofold.

Western blot analysis (WB). Trypsin detached cells were collected and lysed with RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer’s recommendations. RIPA buffer was supplemented with the appropriate amount of protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich). The concentration of proteins was determined using “Pierce™ BCA Protein Assay Kit” (Thermo Fisher Scientific). 50 µg of total protein was used for electrophoresis. Protein samples were stacked in 4 % SDS-PAGE for 1 h at 80 V and separated in 10 % SDS-PAGE for ATG7, ATG12, RIPK1, pRIPK3, serpin B5 or 12 % for LC3B, p62, and cleaved caspase-3 for 3 h at 120 V by “Vertical electrophoresis unit, adjustable height, dual gel” (Sigma-Aldrich). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Thermo Fisher Scientific) by semi-dry blotter “V20-SDB” (Biotech). Membranes were probed with primary antibodies (Table 2).

Table 2. List of antibodies for western blot analysis

Target	Size, kDa	Dilution	Animal	Manufacturer, Cat. no.
α -tubulin	52	5 000	Rabbit	ab52866, Abcam
β -actin	42	5 000	Rabbit	ab8227, Abcam
ATG7	75	1 000	Mouse	MAB6608, R&D Systems
ATG12	17	1 000	Rabbit	701684, Invitrogen
Caspase 3 _{cleaved}	17-19	1 500	Rabbit	9661, Cell Signaling
LC3B	16-18	5 000	Rabbit	ab51520, Abcam
p62	62	10 000	Rabbit	ab109012, Abcam
RIPK1	78	1 000	Mouse	MAB3585, R&D Systems
pRIPK3 _{Ser227}	54	3 000	Rabbit	ab209384, Abcam
Serpin B5	42	1 000	Rabbit	PA5-79979, Invitrogen

The membrane-bound antibodies were detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit (31460, Thermo Fisher Scientific) or anti-

mouse antibodies (31430, Thermo Fisher Scientific). The immunoreactive bands were developed using “Pierce™ ECL western blot analysis substrate” (Thermo Fisher Scientific). Fiji software (Schindelin *et al.*, 2012) was used for densitometric analysis. The levels of protein were normalized to the level of β -actin or α -tubulin that was used as a loading control.

ELISA. IL8 concentration was detected in the cell growth medium. ELISA was performed using “ELISA MAX™ Standard Set Human IL-8” (Biolegend) according to the protocol of the manufacturer. The concentration of IL8 was normalized to the cell number.

Crystal violet (CV) assay. The cells were washed once with PBS and fixed with 96 % ethanol for 10 min. Fixed cells were stained with 0.05 % crystal violet solution in 20 % ethanol for 30 min. After that cells were washed with water and cell-attached dye was eluted with 0.1 % acetic acid solution in 50 % ethanol. The absorbance was measured at 585 nm using a spectrophotometer “Multiskan GO” (Thermo Fisher Scientific).

MTT assay. The cells were washed once with DPBS and incubated with 0.1 mg/mL MTT diluted in DPBS for 1 h in a humidified atmosphere at 37 °C in 5 % CO₂. After incubation solution was taken off and the water-soluble MTT reduction product was eluted with isopropanol. The absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer “Multiskan GO”.

Statistical analysis. “SigmaPlot 14.0” was used for statistical analysis. The “Shapiro-Wilk” criterion was used to test the normality assumption. The “Brown-Forsythe” criterion was used to compare variances. The comparison between two independent samples with a normal distribution was made using either the “Student’s t” criterion (equal variances) or the “Welch t” criterion (unequal variances). The “Mann-Whitney-Wilcoxon” criterion was used to compare two independent samples that are not normally distributed. Data are considered statistically significant when the p-value is equal to or less than 0.05. The p-values are represented in the graphs by */#/^o for $p \leq 0.05$, **/##/^{oo} for $p \leq 0.01$, ***/###/^{ooo} for $p \leq 0.001$.

RESULTS

In this study, we evaluated the molecular mechanisms of acquired resistance to chemotherapeutic drugs in colorectal cancer (CRC) cells. We used resistant sublines derived from two genetically and phenotypically distinct human CRC cell lines HCT116 and SW620. The colorectal carcinoma cell line HCT116, derived from primary tumour, is classified as CMS1 (Fichtner *et al.*, 2020), and has MSI status, CIMP, and *KRAS*^{G13D} and *PIK3CA*^{H1047R} mutations (Ahmed *et al.*, 2013). Colorectal adenocarcinoma cells SW620, derived from lymph node metastases, are classified as CMS2 (Fichtner *et al.*, 2020), have MSS status, CIMP, CIN, and *KRAS*^{G12V} and *TP53*^{R273H, P309S} mutations (Ahmed *et al.*, 2013). Chemoresistant sublines were derived by continuously culturing HCT116 and SW620 cells in a medium containing 5-FU (HCT116/FU and SW620/FU) or OxaPt (HCT116/OXA and SW620/OXA). In this study, we compared the resistance of these cells by assessing 1) the expression of cytokines; 2) the changes in the levels of the serpins; 3) levels of autophagy protein and their importance for resistance.

Cells chemoresistance to 5-FU and OxaPt

To compare the mechanisms of resistance in HCT116 and SW620 cells, we first assessed cell viability after 5-FU and OxaPt treatment (Fig. 3) and the resistance index (RI) by the CV method (Table 3). Treatment of HCT116 cells with 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU resulted in a reduction of viability by 50 % and 70 %, respectively, and 20-30 % for HCT116/FU and HCT116/OXA sublines. In HCT116/FU cells, 1 mM 5-FU reduced viability by 30 % and in HCT116/OXA cells by 40 %. Meanwhile, doses of 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt reduced the viability of HCT116 cells by 50 % and 80 %, respectively, and of HCT116/FU cells by 30 % and 50 %. At these concentrations of OxaPt, HCT116/OXA cell viability was reduced by 10 %. In these cells, a 0.3 mM dose of OxaPt decreased viability by 50 % (Fig. 3A).

Treatment of SW620 cells with 0.3 mM and 1 mM 5-FU reduced viability by 50 % and 70 %, respectively. At these doses, SW620/FU cells showed a 40 % and 50 % decrease in viability and SW620/OXA cells a 40 % and 70 %, respectively. The viability of SW620 cells after 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt treatment decreased by 50 % and 60 %, respectively, SW620/FU cells – 40 % and 50 %, SW620/OXA – 30 % and 50 % (Fig. 3B).

We also found that the SW620 cell line was more resistant to higher doses of drugs compared to HCT116 cells. SW620 cells treated with 0.3 mM 5-FU

and 0.06 mM OxaPt showed higher viability than HCT116 cells by 1.8-fold and 1.7-fold, respectively (both $p < 0.001$).

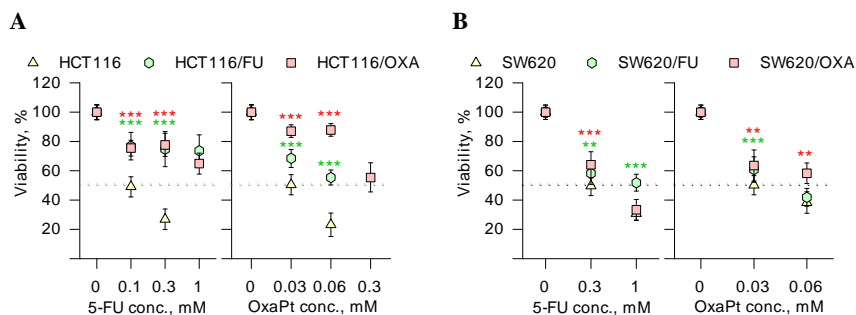


Fig. 3. Viability of HCT116 (A) and SW620 (B) cell lines and their sublines after 5-FU and OxaPt treatment. Viability was measured 48 h after drug treatment. Data presented as mean \pm SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-sensitive and 5-FU (green) or OxaPt (red) resistant cells when exposed to the same doses of drugs (*). **/** indicate that $p \leq 0.01/0.001$.

For further experiments, 5-FU and OxaPt concentrations were selected based on regression analysis of HCT116, HCT116/FU and HCT116/OXA cell viability (Kukcinaviciute *et al.*, 2018) and applied to SW620 cells and their sublines. The doses of 5-FU and OxaPt were chosen to reduce HCT116 cell viability by approx. 50 % and 70 %. For 5-FU, they were 0.1 mM and 0.3 mM, and for OxaPt – 0.03 mM and 0.06 mM, respectively. By comparing the doses of 5-FU and OxaPt causing CTT₅₀ we determined resistance indexes (RI).

Table 3. IC₅₀ and RI values of HCT116 and SW620 cell lines and their chemoresistant sublines.

Cell line	Drug	IC ₅₀ , mM	RI
HCT116	5-FU	0.1	-
	OxaPt	0.03	-
HCT116/FU	5-FU	> 1	> 10
	OxaPt	0.06	2
HCT116/OXA	5-FU	1	10
	OxaPt	0.3	10
SW620	5-FU	0.3	3*
	OxaPt	0.03	-*
SW620/FU	5-FU	1	3.3
	OxaPt	0.06	2
SW620/OXA	5-FU	0.3	-
	OxaPt	0.06	2

* SW620 cell line compared with HCT116.

IC₅₀ – half-maximal inhibitory concentration of 5-FU or OxaPt;

RI – resistance index of chemoresistant sublines – ratio between drug-resistant and drug-sensitive cells IC₅₀.

HCT116/FU cells were more than tenfold more resistant to 5-FU and twofold to OxaPt than HCT116. Although the resistance of HCT116/OXA cells was induced by culturing them with OxaPt, they became tenfold more resistant not only to OxaPt but also to 5-FU compared to HCT116 cells. SW620/FU cells were 3.3-fold more resistant to 5-FU and twofold to OxaPt while SW620/OXA cells were twofold more resistant to OxaPt than SW620 line. Although the acquired resistance of SW620/FU cells to 5-FU was threefold lower than that of HCT116/FU cells, the parental SW620 cells were threefold more resistant to 5-FU than HCT116 cells (Table 3).

Cytokine expression in HCT116 cells and their sublines

Cytokines are important for tumour development and resistance, so we investigated how cytokine expression changed in HCT116/FU and HCT116/OXA sublines compared to HCT116 cells. We assessed cytokine expression in relation to two reference genes: *HPRT* and *TBP*. We considered a change in gene expression to be biologically significant only if it changed at least twofold for both reference genes.

We found that HCT116/FU cells showed increased expression of many cytokines compared to HCT116. In these cells, the following cytokine transcripts were increased considerably: *CXCL8* (14.3-fold by *HPRT*; 11.6-fold by *TBP*), *IL1A* (10.4-fold by *HPRT*; 8.2-fold by *TBP*) and *IL32* (8.3-fold by *HPRT*; 6.5-fold by *TBP*). The following transcripts showed a 3-5-fold increase in expression: *TNF*, *EGF*, *CXCL5* and *IL12A*. Expression of *IL6*, *CXCL3*, *CXCL4* and *CXCL10* was increased by 2-3-fold. Compared to the parental cells, cytokine expression in the HCT116/OXA subline changed slightly. Expression of *IL6* (5.6-fold by *HPRT*; 4-fold by *TBP*), *CXCL1* (2.2-fold by *HPRT*; 3.1-fold by *TBP*) and *CXCL11* (4.1-fold by *HPRT*; 3.4-fold by *TBP*) transcripts increased, while *IL7* decreased (7.6-fold by *HPRT*; 5.1-fold by *TBP*) (Fig. 4).

We also assessed the levels of transcripts encoding cytokine receptors. The receptors we selected were IL1R1 (ligands IL1 α and IL1 β), IL6R (IL6), CCR9 (CCL25), CXCR1 (IL8 and CXCL6), CXCR2 (IL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7), CXCR4 (CXCL12 α and β) and EGFR (EGF). We found that in the HCT116/FU cells, these transcript levels increased, compared to HCT116 line: *CXCR1* (5-fold by *HPRT*; 3.7-fold by *TBP*) and *CXCR2* (5.6-fold by *HPRT*; 3.8-fold by *TBP*) while *CXCR4* decreased (2-fold by *HPRT*; 2.5-fold by *TBP*). In HCT116/OXA cells, *CXCR1* (14-fold by *HPRT*; 11.4-fold by *TBP*) and *CXCR4* (2.9-fold by *HPRT*;

2.3-fold by *TBP*) transcript levels increased, while *CXCR2* decreased (2.8-fold by *HPRT*; 3.1-fold by *TBP*) (Fig. 4).

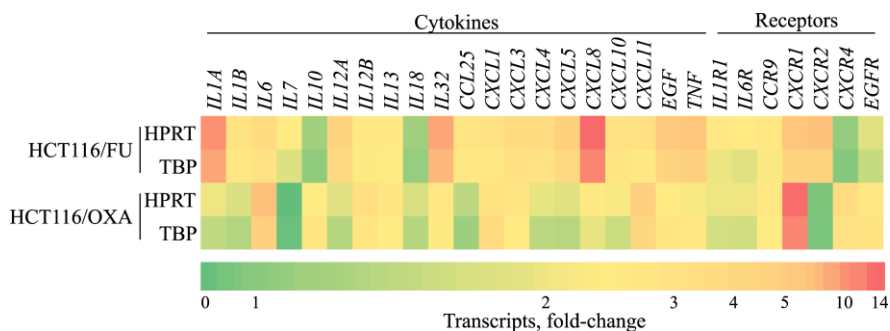


Fig. 4. Levels of cytokine and their receptor transcripts in HCT116/FU and HCT116/OXA sublines compared to HCT116 cells. qPCR was performed 96 h after seeding. Transcript levels were normalised to *HPRT* and *TBP* reference genes. Changes were counted from HCT116 cells. Data presented as mean of fold-change, n = 3.

Next, we evaluated the changes in cytokine transcript levels after exposure to 5-FU or OxaPt. We selected *IL1A*, *IL6*, *IL32*, *CXCL8*, *EGF*, *CXCR1*, *CXCR2* and *EGFR*. HCT116 cells and their sublines responded differently to treatment. In HCT116 cells, both drugs significantly altered cytokine expression, with HCT116/FU cells showing a greater change in cytokine expression after OxaPt treatment, and HCT116/OXA cells showing the effect after 5-FU treatment. In HCT116 cells, exposure to 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU increased levels of *IL1A* by 6.4 and 11-fold, *IL32* by 2.2 and 3.8-fold, *CXCL8* by 5.4 and 17.4-fold, *CXCR1* by 13.2 and 19.5-fold, *CXCR2* by 23.6 and 29.4-fold, respectively. In these cells, after 0.3 mM 5-FU exposure, *IL6* and *EGF* transcript levels increased 2.3 and 2.1-fold, respectively, while *EGFR* levels increased 2.4-fold after a dose of 0.1 mM 5-FU. In HCT116/FU cells, after doses of 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU *IL6* levels increased by 2.9 and 4.5-fold, *CXCR1* by 2.4-fold in both cases, *CXCR2* by 2.8 and 2.5-fold, respectively. In HCT116/OXA cells, these doses of 5-FU increased levels of *IL1A* by 3.3 and 4.8-fold, *CXCL8* by 5.5 and 9.1-fold, *CXCR1* by 10.9 and 18.9-fold, respectively. *IL6*, *EGF* and *CXCR2* levels increased by 2, 2.3 and 2.4-fold, respectively, after a 0.3 mM dose of 5-FU (Fig. 5).

OxaPt had the greatest effect on the transcript levels of HCT116 and HCT116/FU cells. In HCT116 cells, doses of 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt increased levels of *IL1A* by 3.4 and 8.6-fold, *IL6* by 3 and 9.1-fold, *IL32* by 2.2 and 4-fold, *CXCL8* by 2.7 and 9.8-fold and *EGF* by 2 and 2.5-fold, *CXCR1* by 11 and 17.1-fold, *CXCR2* by 15.1 and 7.4-fold, respectively. In these cells, the levels of *EGFR* increased by 3.1-fold after 0.03 mM OxaPt exposure. In

HCT116/FU cells, exposure to 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt increased the levels of *IL1A* by 2.3 and 3.4-fold, *IL6* by 7.5 and 16.7-fold, *CXCL8* by 2.8 and 6.6-fold, *CXCR1* by 7.4 and 11.4-fold, respectively. *CXCR2* and *EGFR* levels increased after exposure to 0.03 mM OxaPt by 4.6 and 2-fold, respectively. In HCT116/OXA cells, *CXCR1* levels increased by 2.2 and 3.7-fold after doses of 0.03 mM and 0.06 mM, while *CXCR2* levels decreased by 2 and 3.1-fold, respectively (Fig. 5).

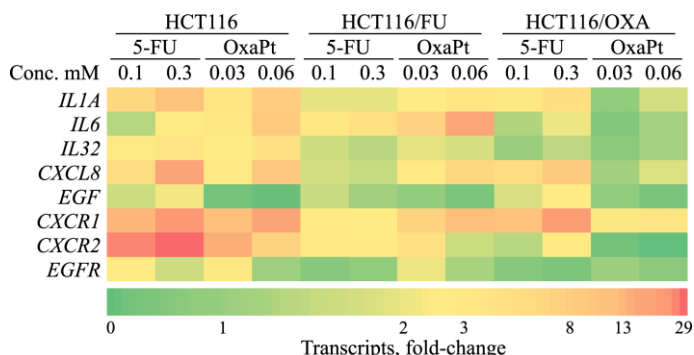


Fig. 5. Effect of 5-FU and OxaPt on the levels of cytokines and their receptor transcripts in HCT116 cells and their sublines. qPCR was performed 24 h after exposure. Cytokine expression after drug treatment was compared with untreated cells. Transcript levels were normalised to the *HPRT* reference gene. Data presented as mean of fold-change of technical replicates, n = 3.

To summarise the changes in cytokine expression, it can be concluded that: 1) compared to the HCT116 line, in HCT116/FU cells the expression of these cytokine transcripts increased: *IL1A*, *IL6*, *IL12A*, *IL32*, *CXCL3*, *CXCL4*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL10*, *EGF*, *TNF*, *CXCR1*, *CXCR2*, but *CXCR4* levels decreased, and in HCT116/OXA cells *IL6*, *CXCL1*, *CXCL11*, *CXCR1* increased while *IL7* and *CXCR4* decreased; 2) HCT116 cells showed an increase in cytokine transcript levels after treatment with 5-FU and OxaPt, HCT116/FU cells – after treatment with OxaPt, and HCT116/OXA cells – after 5-FU treatment.

Changes in serpin levels in HCT116, SW620 cells and their sublines

Serpins are serine protease inhibitors that may promote tumour development (Mkaouar *et al.*, 2019), however, there is limited knowledge about their role in chemotherapeutic drug induced resistance. Therefore, in further work, we determined changes in serpin expression in chemoresistant CRC cells.

Changes in the expression of serpin transcripts

In this study, we determined the expression of serpins in HCT116, SW620 cells and their chemoresistant sublines. For serpin expression studies, we selected serpin B1 (SB1), B5 (SB5), E1 (SE1) and E2 (SE2). First, we compared the levels of serpin transcripts in resistant sublines with the parental lines. In the HCT116/FU subline, *SB5* levels were increased (2-fold by *HPRT* and 2.8-fold by *TBP*) compared to HCT116 cells (Fig. 6A). The SW620/FU subline showed a decrease in *SB5* (2.6-fold by *HPRT* and 2.8-fold by *TBP*) and *SE2* (3.2-fold by *HPRT* and 3.6-fold by *TBP*) levels compared to SW620 cells (Fig. 6B). HCT116/OXA and SW620/OXA sublines did not show any change in the levels of serpins compared to parental cells.

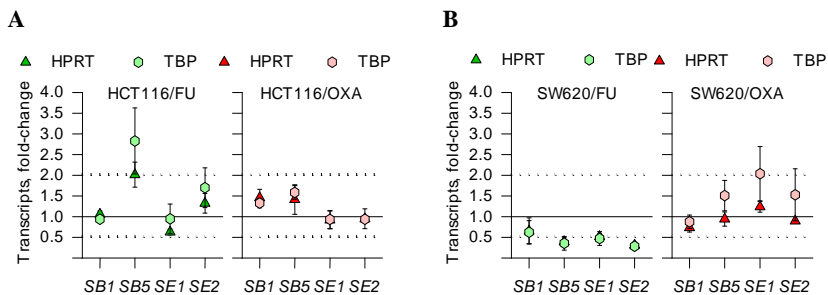


Fig. 6. Changes in serpin transcript levels in HCT116/FU, HCT116/OXA (A) and SW620/FU, SW620/OXA (B) sublines. qPCR was performed 96 h after cell seeding. Transcript levels were normalised to *HPRT* and *TBP* reference genes. Changes were counted from parental lines (solid lines). Dotted lines indicate a biologically significant change. Data presented as mean \pm SD, n = 3.

We further evaluated how 5-FU and OxaPt alter serpin transcript levels in HCT116 and SW620 cells and their sublines. We found that in HCT116 cells, doses of 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU increased the *SB5* levels by 9.9 and 11.9-fold, and the *SE1* levels by 9.5 and 11.8-fold, respectively. *SE2* levels in these cells increased 2.2-fold after exposure to 0.3 mM 5-FU. In HCT116/FU cells, after these 5-FU doses, *SB5* increased 2.7 and 3.7-fold, respectively, and *SE1* increased approximately 3-fold in both cases. In HCT116/OXA cells, exposure to 0.3 mM 5-FU resulted in a 2-fold increase in *SB1* levels. Exposure of these cells to 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU resulted in a 2.4 and 3.2-fold increase in *SB5* and a 3 and 4-fold increase in *SE1* levels, respectively (Fig. 7).

OxaPt increased the levels of *SB5* and *SE1* in HCT116 and HCT116/FU cells. In HCT116 cells, 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt increased *SB5* levels by more than 9-fold at both doses and *SE1* levels by 7.8-fold at both doses. In HCT116/FU cells, after exposure to these doses of OxaPt, the *SB5* levels

increased 6-fold in both cases and the *SE1* levels increased by 5.5 and 8.3-fold, respectively (Fig. 7).

In SW620 cells, doses of 0.3 mM and 1 mM 5-FU increased the levels of *SB5*, *SE1* and *SE2* by just over 2-fold. In SW620/FU cells, doses of 1 mM and 4 mM 5-FU increased the levels of *SB5* by 4.3 and 3.1-fold, respectively, and *SE1* by 2.2-fold in both cases. In SW620/OXA cells, 1 mM 5-FU increased *SB1* levels by 2-fold. Treatment of these cells with 0.3 mM and 1 mM 5-FU resulted in a 3.1 and 2.4-fold increase in *SB5* levels, respectively, and a more than 2-fold increase in *SE2* at both doses (Fig. 7).

In SW620 line, 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt doses resulted in a 2.2 and 5.2-fold increase in levels of *SB5* and a 2.2 and 3.1-fold in *SE1* respectively. In SW620/FU cells, these doses resulted in a 3.5 and 7.2-fold increase in *SB5* levels, respectively. In these cells, a dose of 0.06 mM OxaPt reduced *SB1* and *SE2* levels by 2.5-fold in both cases. In SW620/OXA cells, 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt doses increased *SB5* levels by 4-fold in both cases, while *SE2* levels decreased by 2.3-fold after 0.06 mM treatment (Fig. 7).

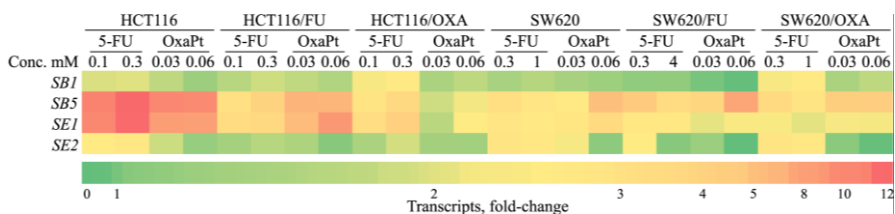


Fig. 7. Effect of 5-FU and OxaPt on the levels of *SERPINB1* (*SB1*), *SB5*, *SE1* and *SE2* transcripts in HCT116, SW620 cells and their sublines. qPCR was performed 24 h after exposure. Serpin expression after drug treatment was compared with untreated cells. Transcript levels were normalised to the *HPRT* reference gene. Data presented as mean of fold-change, n = 3.

To summarise the transcript expression results, we can say that: 1) compared to the parental lines, HCT116/FU cells showed an increase in *SB5* expression, while SW620/FU cells showed a decrease in *SB5* and *SE1* levels; 2) 5-FU increased the *SB5* and *SE1* levels in HCT116, SW620 cells and their sublines; 3) OxaPt increased *SB5* in HCT116, HCT116/FU and SW620 cells and their resistant sublines, while *SE1* levels were increased in HCT116, HCT116/FU and SW620 cells.

Changes in serpin B5 protein levels

For further studies, we chose *SB5*, and determined its expression at protein level. It is known that *SB5* can be localised in different compartments of cell, which determines its function (Goulet *et al.*, 2011). Furthermore, *SB5* nuclear

and cytoplasmic localisation in CRC may determine tumour cell aggressiveness (Gurzu, Jung, 2021), and therefore we first isolated nuclear and cytoplasmic fractions of HCT116, SW620 cells and their sublines and samples were fractionated in SDS-PAGE. We found that the two forms of SB5 seen on SDS-PAGE belong to different cell fractions. Based on SB5 movement on SDS-PAGE, we found that cytoplasmic SB5 has a size of ~42 kDa, while nuclear SB5 moves more slowly and therefore is larger than 42 kDa. Comparing total cell lysate, we found that HCT116 cells and their sublines are dominated by the cytoplasmic form of SB5, while SW620 cells and their sublines have more SB5 in the nucleus (Suppl. 4, Fig. 1).

Next, we determined changes in SB5 protein levels in HCT116, SW620 lines and their sublines. We found that SB5 levels increased 4-fold in HCT116/FU and 2.2-fold in HCT116/OXA ($p < 0.001$ in both cases) cells, compared to the HCT116. Treatment with 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU of HCT116 cells resulted in an 8.1-fold increase in SB5 levels in both cases ($p < 0.001$). In HCT116/FU cells, SB5 levels increased 8.5 and 9-fold after 0.3 mM and 1 mM doses of 5-FU, respectively ($p < 0.001$). In HCT116/OXA cells, SB5 levels were increased after 0.1 mM and 0.3 mM doses of 5-FU by 3.5 ($p = 0.03$) and 3.9-fold ($p = 0.005$), respectively. OxaPt treatment increased SB5 levels in HCT116 and HCT116/FU cells. In HCT116 cells, after 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt treatment SB5 levels increased 8.8 ($p < 0.001$) and 4.8-fold ($p = 0.006$), in HCT116/FU cells by 6.4 ($p = 0.03$) and 9.6-fold ($p < 0.001$), respectively (Fig. 8).

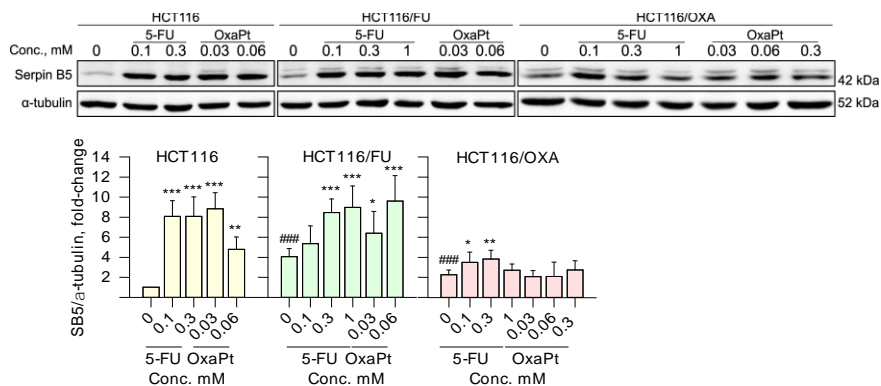


Fig. 8. Changes in serpin B5 (SB5) protein levels in HCT116 cells and their sublines. SB5 levels were measured 48 h after drug exposure. Data presented as mean + SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between cells: drug-sensitive and resistant (#); treated and untreated (*). **/** indicate that $p \leq 0.05/0.01$; ###/### – $p \leq 0.001$.

In SW620 cells and their sublines, we assessed changes in SB5 protein levels in both the cytoplasm (SB5_C, Fig. 9B) and the nucleus (SB5_N, Fig. 9C).

Compared to SW620 cells, the SB5_C levels decreased 3-fold in SW620/FU subline ($p < 0.001$), while in SW620/OXA cells, in contrast, it increased 1.2-fold ($p = 0.003$). SB5_B levels were similar between cell lines.

Exposure to 5-FU or OxaPt increased SB5_C levels, while SB5_N levels varied depending on the cells and the drug dose. In SW620 cells, doses of 0.3 mM and 1 mM 5-FU increased SB5_C levels by 1.8 and 1.3-fold ($p < 0.001$), in SW620/FU cells, by 3.6 ($p < 0.001$) and 2.3-fold ($p = 0.002$), respectively. Treatment of SW620 cells with 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt resulted in a 1.9 and 1.4-fold ($p < 0.001$) increase in SB5_C levels, and the SW620/FU cells – 2.1 ($p = 0.001$) and 2.3-fold ($p = 0.002$), respectively. In SW620/OXA cells, SB5_C levels increased 1.6-fold after a dose of 0.06 mM OxaPt ($p = 0.01$) (Fig. 9A-B).

In SW620 cells, 0.3 mM 5-FU increased SB5_N levels by 1.4-fold ($p = 0.007$), while 1 mM dose decreased SB5_N levels by 2.2-fold ($p = 0.002$). In SW620/FU cells, exposure to 0.3 mM 5-FU increased SB5_N levels 1.5-fold ($p = 0.04$). In SW620/OXA cells, SB5_N levels decreased 3.3-fold after exposure to 1 mM 5-FU ($p = 0.02$). At a dose of 0.03 mM OxaPt, SB5_N levels in SW620 cells increased 2.3-fold ($p = 0.008$). In SW620/FU cells, SB5_N levels decreased at 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt doses by 1.2 ($p = 0.02$) and 1.8-fold, respectively ($p < 0.001$). In SW620/OXA cells, SB5_N levels decreased 2-fold ($p = 0.04$) after exposure to 0.06 mM OxaPt (Fig. 9A, C).

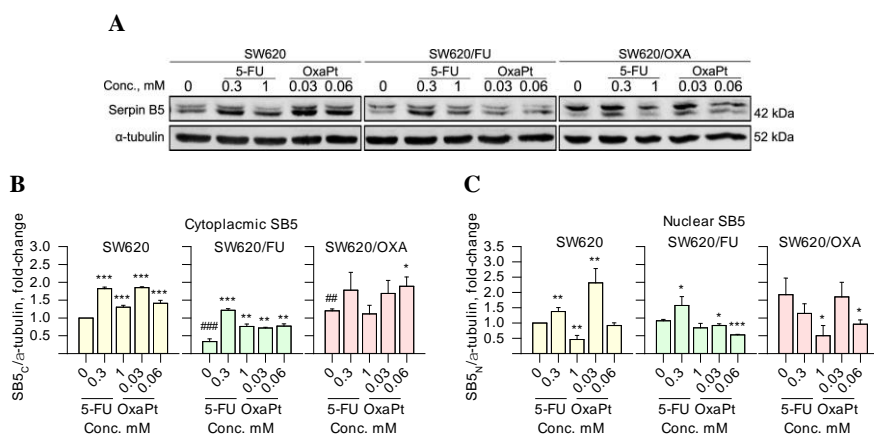


Fig. 9. Changes in serpin B5 protein levels in SW620 cells and their sublimes. The SB5 levels in cytoplasm (SB5_C) (B) and nucleus (SB5_N) (C) were measured 48 h after drug treatment. Data presented as mean + SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between cells: drug-sensitive and resistant (#); drug-treated and untreated (*). * indicates that $p \leq 0.05$; ##/* - $p \leq 0.01$; ###/*** - $p \leq 0.001$.

To summarise the results, we can draw the following conclusions: 1) compared to the parental cell lines HCT116/FU, HCT116/OXA and SW620/OXA cells showed an increase SB5 levels in cytoplasm, while SW620/FU cells showed a decrease; 2) SB5 levels in cytoplasm increased after 5-FU treatment in all the cell lines, except SW620/OXA cells, while after OxaPt treatment – in all cell lines except in HCT116/OXA cells; 3) the levels of SB5 in nucleus in SW620 cells and their sublines depended on the cell line, drug and the concentration.

Role of autophagy in resistance

In this study, we compared the changes in autophagy protein levels between parental HCT116 and SW620 lines and their chemoresistant sublines. Also, we determined autophagy protein levels after treatment with 5-FU or OxaPt and assessed the role of autophagy in OxaPt resistance. We evaluated levels of ATG7, ATG12, LC3B-II protein form (hereafter LC3B-II) and autophagic flux (intensity). ATG7 and ATG12 are essential autophagy proteins involved in autophagosome biogenesis (Section 1.6.1). Autophagic flux was determined by changes in LC3B-II levels. During the formation of autophagic membranes, the LC3B protein (LC3B-I form) is conjugated to phosphatidylethanolamine (PE) and converted to the LC3B-II. This form is used as a marker of autophagy because the amount of LC3B-II correlates with the number of autophagosomes, and part of LC3B-II is degraded during the final stages of autophagy when autophagosomes fuse with lysosomes (Nakatogawa, 2020). Thus, autophagic flux is determined by the amount of LC3B-II accumulated when degradation in autolysosomes is suppressed by inhibitors of lysosomal function (Klionsky *et al.*, 2021). For the measurement of autophagic flux, cells were incubated with 30 μ M chloroquine (CQ) for 4 h before cell lysis. CQ is an inhibitor that increases the pH of lysosomes and thus interferes with degradation. In the case of elevated autophagic flux, higher levels of LC3B-II are detected in samples with CQ than in samples without CQ (Mauthe *et al.*, 2018).

Changes in ATG7 and ATG12 protein levels

In previous studies, HCT116/FU and HCT116/OXA cells were found to have higher levels of ATG7 protein, compared to HCT116 cells and 5-FU or OxaPt treatment reduced it in HCT116 and HCT116/FU cells. In HCT116/OXA cells, 5-FU decreased, while OxaPt increased ATG7 levels (Kukcinavičiūtė, 2019). In the present study, we assessed changes in ATG12

protein levels. We found that in HCT116/OXA cells ATG12 levels increased by 1.7-fold ($p = 0.001$), compared to HCT116 line (Fig. 10). We further assessed how the levels of ATG12 changed after 5-FU or OxaPt treatment. We found that after 0.1 mM and 0.3 mM of 5-FU doses ATG12 levels decreased by 4.1 and 3.6-fold ($p < 0.001$) in HCT116 cells, respectively, 1.9 and 1.6-fold ($p < 0.001$) in HCT116/FU cells, and 4.4 ($p < 0.001$) and 2.2-fold ($p = 0.007$) in HCT116/OXA cells (Fig. 10A). Exposure to OxaPt reduced the levels of ATG12 in HCT116 and HCT116/FU. In HCT116 cells, doses of 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt reduced ATG12 levels by 3-fold in both cases ($p < 0.001$), while in HCT116/FU cells by 2 and 3.4-fold ($p < 0.001$ for both cases), respectively (Fig. 10B).

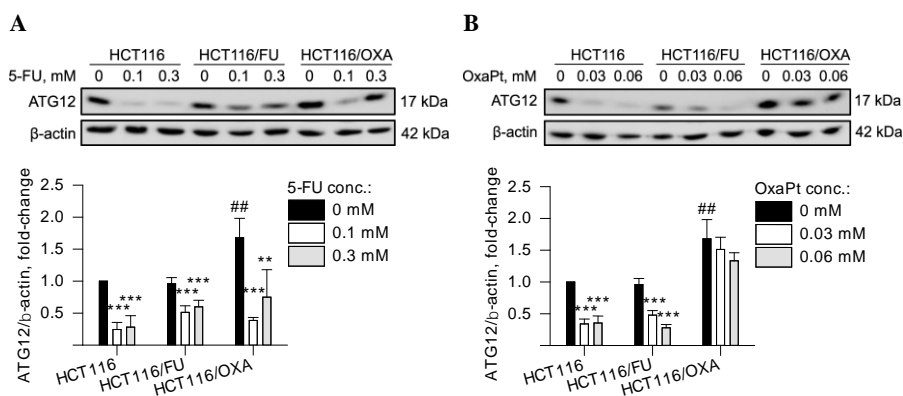


Fig. 10. Changes in ATG12 protein levels in HCT116 cells and their sublines. ATG12 levels were determined 48 h after treatment with 5-FU (A) or OxaPt (B). Data presented as mean + SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-sensitive and chemoresistant lines (#); drug-treated and untreated cells (*). ##/** indicate that $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$.

We further evaluated the changes in ATG7 and ATG12 levels in SW620 cells and their sublines. We found that treatment with 5-FU or OxaPt resulted in a decrease in ATG7 levels and an increase in ATG12 levels. In SW620 cells, doses of 0.3 mM and 1 mM 5-FU reduced ATG7 levels by 1.7 and 2.3-fold ($p < 0.001$), in SW620/FU cells by 1.5 ($p = 0.02$) and 1.9-fold ($p = 0.001$), in SW620/OXA cells by 1.6 ($p = 0.02$) and 2.1-fold ($p = 0.006$), respectively (Fig. 11A). In SW620 cell line, doses of 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt reduced ATG7 levels by 1.4 and 2-fold ($p < 0.001$), in SW620/FU cells 1.4 ($p = 0.04$) and 2.1-fold ($p = 0.001$) and in SW620/OXA cells 1.7 ($p = 0.04$) and 1.9-fold ($p = 0.009$), respectively (Fig. 11B).

In contrast to ATG7 level changes, ATG12 protein levels increased after exposure to 5-FU or OxaPt. In SW620 cells after exposure to 0.3 mM and

1 mM 5-FU, it increased 1.8 ($p = 0.03$) and 3.9-fold ($p = 0.003$), respectively, while in SW620/FU and SW620/OXA cells, it increased 3-fold ($p < 0.001$) after exposure to 1 mM 5-FU (Fig. 11A). At a dose of 0.06 mM OxaPt, ATG12 levels increased 2.2-fold ($p < 0.001$) in SW620 cells, 1.9-fold ($p = 0.01$) in SW620/FU and 2.8-fold ($p = 0.008$) in SW620/OXA (Fig. 11B).

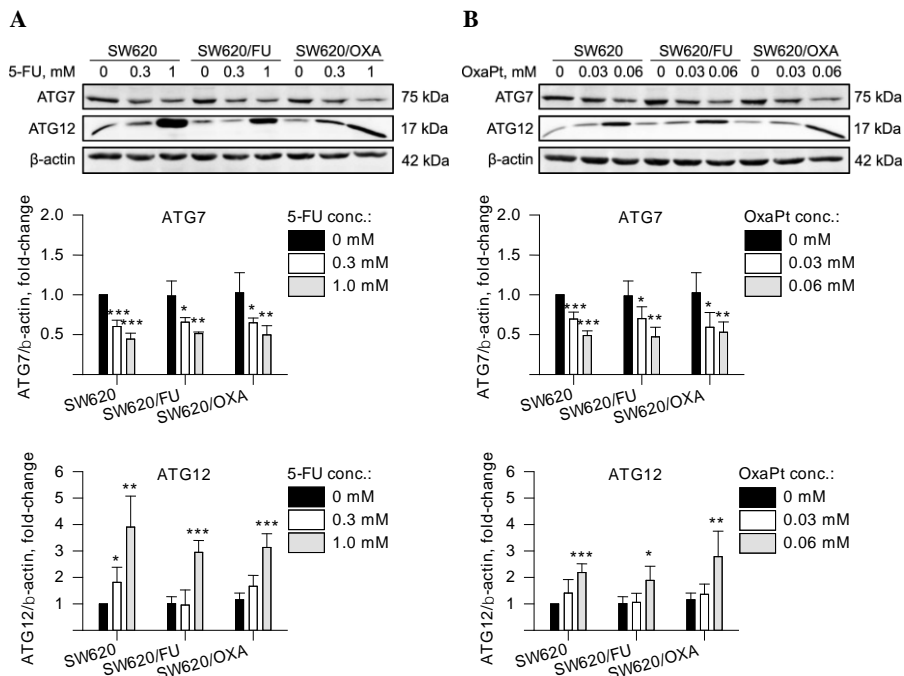


Fig. 11. Changes in ATG7 and ATG12 protein levels in SW620 cells and their sublines. ATG7 and ATG12 levels were determined 48 h after treatment with 5-FU (A) or OxaPt (B). Data presented as mean + SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-treated and untreated cells (*). **/**/** indicate that $p \leq 0.05/0.01/0.001$.

To summarise the results, we can conclude that 1) ATG12 levels increased in HCT116/OXA cells compared to the HCT116; 2) 5-FU reduced ATG12 levels in HCT116 cells and their sublines, whereas OxaPt reduced it in HCT116 and HCT116/FU cells; 3) 5-FU or OxaPt treatment decreased ATG7 levels but increased ATG12 levels in SW620 cells and their sublines.

Changes in autophagosome amount and autophagic flux

Previous studies have shown that in HCT116 cells and their sublines, the amount of autophagosomes and autophagic flux depended on the cell line and the treatment (Kukcinavičiūtė, 2019). HCT116/FU and HCT116/OXA cells showed a reduced autophagic flux compared to HCT116. 5-FU treatment

reduced autophagic flux in HCT116, HCT116/FU and HCT116/OXA cells. The effects of OxaPt on autophagic flux was dose and cell line-dependent. A dose of 0.06 mM OxaPt reduced autophagic flux in HCT116 and HCT116/FU cells, whereas in HCT116/OXA cells increased (Kukcinavičiūtė, 2019).

In this study, we assessed the autophagosome amount and autophagic flux in SW620 cells and their sublines. First, we determined changes in autophagy in resistant sublines. In SW620/FU cells, LC3B-II levels decreased 1.3-fold ($p = 0.03$), whereas in SW620/OXA cells contrary, increased by 1.7-fold ($p < 0.001$). The autophagic flux increased 1.3-fold in SW620/FU cells and 2.2-fold in SW620/OXA cells (Fig. 12 and Table 4).

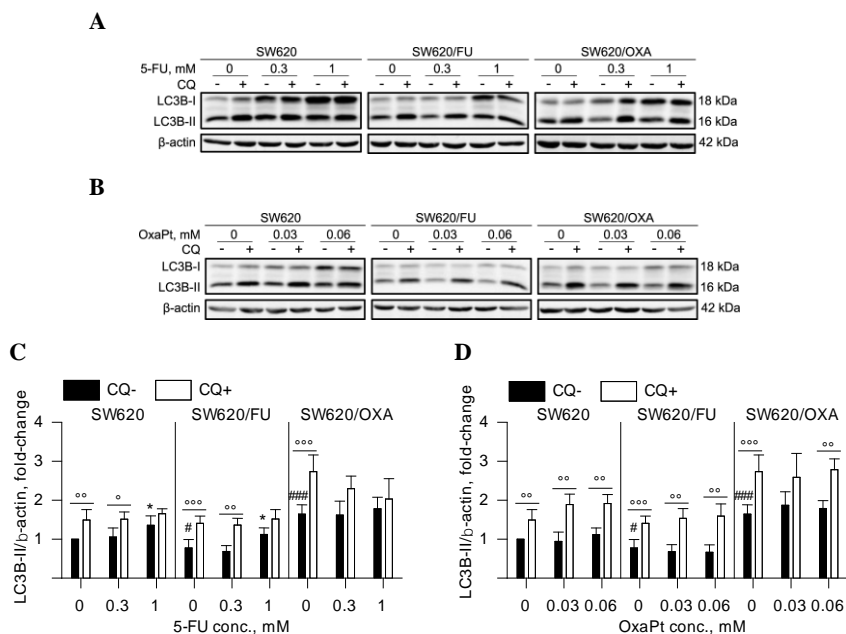


Fig. 12. Changes in LC3B-II levels and autophagic flux in SW620 cells and their sublines. LC3B-II levels were measured 48 h after exposure to 5-FU (A and C) or OxaPt (B and D). To determine autophagic flux, cells were incubated with 30 μ M CQ for 4 h before cell lysis. Data presented as mean + SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-sensitive and resistant cells (#); drug-treated and untreated cells (*); cells with and without CQ (°). #/°/° indicate that $p \leq 0.05$; °° – $p \leq 0.01$; ###/°°°, – $p \leq 0.001$.

We further evaluated the effects of 5-FU and OxaPt on autophagy. In SW620 cells, a 1 mM 5-FU increased LC3B-II levels by 1.4-fold ($p = 0.03$) and in SW620/FU cells by 1.5-fold ($p = 0.04$). We also determined the autophagic flux. In SW620 and SW620/FU cells, a dose of 1 mM 5-FU reduced autophagic flux by 1.6-fold. In SW620/OXA cells, 0.3 mM and 1 mM doses of 5-FU reduced the autophagic flux by 1.6 and 4.4-fold, respectively

(Fig. 12A, C and Table 4). OxaPt treatment had the opposite effect of increasing autophagic flux in SW620 and SW620/FU cells. In SW620 cells after exposure to 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt, autophagic flux increased by 1.9 and 1.6-fold, and in SW620/FU cells by 1.4 and 1.5-fold, respectively. In SW620/OXA cells, the autophagic flux decreased by 1.5-fold after exposure to 0.03 mM OxaPt (Fig. 12B, D and Table 4).

Table 4. Autophagic flux by LC3B-II level in SW620 cells and their sublines.

Drug conc., mM	SW620			SW620/FU			SW620/OXA			
	Flux		p	Flux		p	Flux		p	
-	0	0.49	0.009	0.63	↑*	<0.001	1.1	↑*	<0.001	
5-FU	0.3	0.46	-	0.02	0.68	-	0.003	0.68	↓	>0.05
	1	0.3	↓	>0.05	0.39	↓	>0.05	0.25	↓	>0.05
OxaPt	0.03	0.95	↑	0.002	0.86	↑	0.001	0.72	↓	>0.05
	0.06	0.8	↑	0.001	0.93	↑	0.007	0.99	-	0.001

* Compared to the SW620 line, elsewhere it is compared to untreated cells.

Flux – the difference between the averages of cells with CQ (CQ+) and without (CQ-).

Flux: increased ↑; decreased ↓; unchanged -; p – a statistically significant difference between CQ- and CQ+.

Taken together, these results showed that: 1) compared to SW620 cells, autophagosomes amount decreased in the SW620/FU subline but increased in the SW620/OXA and autophagic flux increased in both sublines; 2) 5-FU treatment increased LC3B-II levels in SW620 and SW620/FU cells but decreased autophagic flux in all cell lines; 3) OxaPt increased autophagic flux in SW620 and SW620/FU cells but decreased it in SW620/OXA.

Role of autophagy in the viability of HCT116 cells and their sublines

Since HCT116/OXA cells showed an increase in autophagic flux in response to OxaPt treatment and a decrease in response to 5-FU treatment (Kukcinavičiūtė, 2019), we next sought to assess the role of autophagy in OxaPt-induced resistance. We used specific siRNAs to reduce the levels of *ATG5*, *ATG7* and *ATG12*, molecules involved in autophagosome biogenesis. In HCT116 cells, the levels of *ATG5*, *ATG7* and *ATG12* transcripts were reduced by 3.1, 4.1 and 5.4-fold, respectively. In HCT116/FU cells, these transcripts were downregulated by 2.6, 3.5 and 4.1-fold, respectively. In HCT116/OXA cells, *ATG5* and *ATG7* transcripts decreased by 4.4-fold and *ATG12* transcripts decreased by 4.1-fold (Fig. 13A).

We determined by crystal violet (CV) assay that silencing of *ATG7* and *ATG12* expression reduced the viability of HCT116 cells by 19 % (p = 0.007) and 30 % (p = 0.006), respectively. Silencing of *ATG12* expression made

these cells more sensitive to the OxaPt, with a 20 % decrease in viability at both doses ($p = 0.002$ for 0.03 mM; $p < 0.001$ for 0.06 mM) (Fig. 13B). The viability of untreated HCT116/FU cells decreased following silencing of *ATG5* and *ATG12* expression by 17 % ($p = 0.009$) and 26 % ($p = 0.004$), respectively. Silencing of *ATG12* expression reduced HCT116/FU cell viability by 12 % after both doses of OxaPt ($p = 0.002$ for 0.03 mM; $p = 0.003$ for 0.06 mM) (Fig. 13C). Silencing *ATG7* and *ATG12* expression reduced HCT116/OXA cell viability by 8 % ($p = 0.02$) and 21 % ($p = 0.03$), respectively (Fig. 13D).

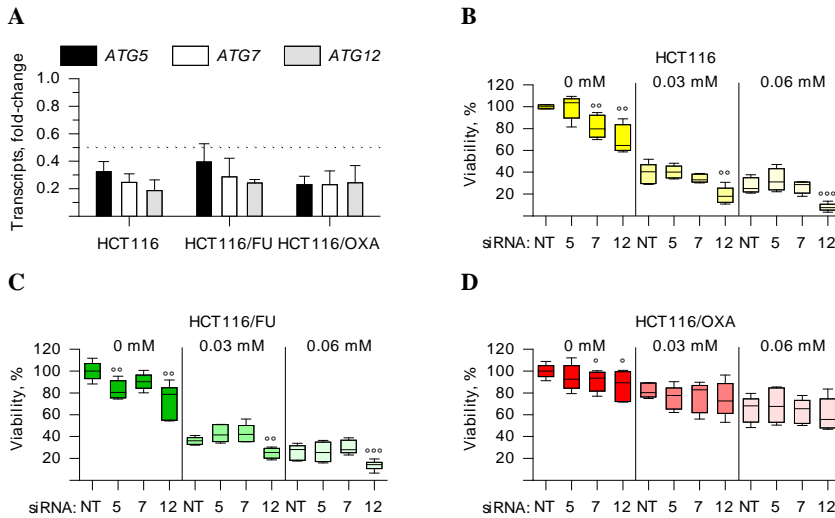


Fig. 13. Role of *ATG5*, *ATG7* and *ATG12* in OxaPt-induced resistance in HCT116 cells and their sublines. Transfection efficiency assessment at mRNA levels (A). Cell viability of HCT116 (B), HCT116/FU (C) and HCT116/OXA (D) cells was measured by the CV after transfection (72 h) and OxaPt treatment (48 h). In panel A, colours indicate transcript and specific siRNA. NT – a mixture of non-specific siRNAs; 5 – *ATG5*, 7 – *ATG7*, 12 – *ATG12* transcript-specific siRNA. Data presented as mean + SD (A); or median with interquartile ranges (B-D), $n \geq 3$. ° shows a statistically significant difference between cells treated with NT and specific siRNAs. °/°/°° indicate that $p \leq 0.05/0.01/0.001$.

The results suggest the conclusion that *ATG12* is important for the survival of HCT116, HCT116/FU and HCT116/OXA cells, and its silencing increased the sensitivity of HCT116 and HCT116/FU cells to OxaPt treatment.

Role of p62 in chemoresistance

Further, we determined changes in the levels of the selective autophagy receptor p62 in HCT116, SW620 cells and their sublines. First, we assessed p62 levels and autophagic flux. As p62 is degraded in autolysosomes during

autophagy, the autophagic flux can be determined when lysosomal function is disrupted (Yoshii, Mizushima, 2017, Ueno, Komatsu, 2020). Next, we determined p62 significance for resistance of HCT116 cells and their sublines by downregulating p62 expression with a specific siRNA.

Changes in p62 levels and autophagic flux

We found that the levels of p62 protein increased 1.8-fold ($p < 0.001$) in HCT116/FU cells compared to HCT116. Treatment with 5-FU reduced p62 levels only in HCT116 cells: 1.4-fold at a dose of 0.1 mM and 5.7-fold at a dose of 0.3 mM 5-FU ($p < 0.001$ in both cases) (Fig. 14A, C). OxaPt treatment reduced p62 levels in HCT116 cells and HCT116/FU subline which has a low level of resistance to this drug. The levels of p62 after exposure to 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt in HCT116 cells decreased 1.5 ($p = 0.007$) and 7.9-fold ($p < 0.01$), in HCT116/FU cells 1.5 ($p = 0.005$) and 1.8-fold ($p < 0.001$), respectively (Fig. 14B, C). Next, we found that in HCT116 cells, doses of 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt increased autophagic flux by 6.2 and 8-fold, respectively ($p = 0.02$ in both cases), while in HCT116/OXA cells, 0.03 mM OxaPt increased it by 5-fold ($p = 0.049$) (Fig. 14B, D).

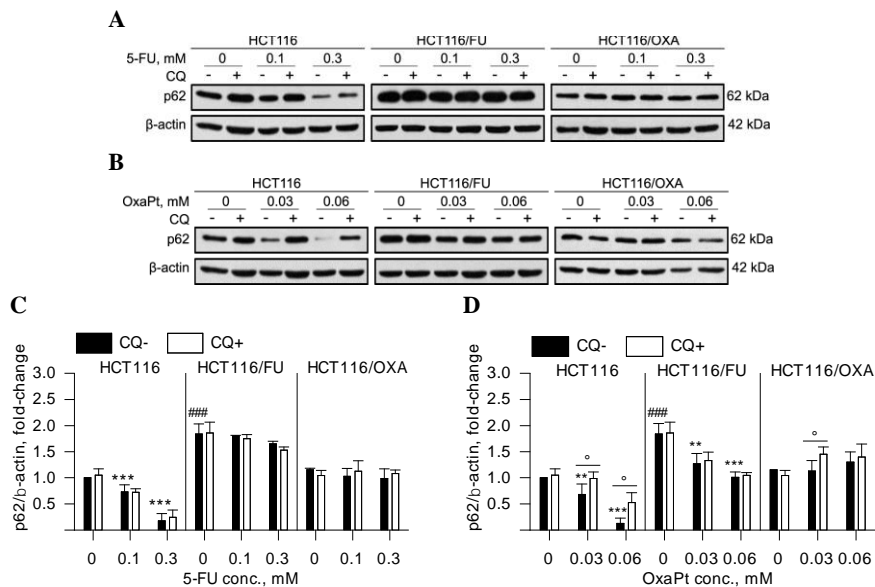


Fig. 14. p62 protein levels in HCT116 cells and their sublines. p62 levels were measured 48 h after exposure to 5-FU (A and C) or OxaPt (B and D). To determine autophagic flux, cells were incubated with 30 μ M CQ for 4 h before cell lysis. Data presented as mean + SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-sensitive and resistant cells (#); drug-treated and untreated cells (*); cells with and without CQ (°). ° indicates that $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; ###/***, – $p \leq 0.001$.

In SW620/FU cells, a 1.4-fold decrease in levels of p62 was observed at a dose of 0.06 mM OxaPt ($p = 0.02$). Compared to SW620, in SW620/OXA subline autophagic flux was increased ($p = 0.048$) and was abolished by drug treatment (Fig. 15).

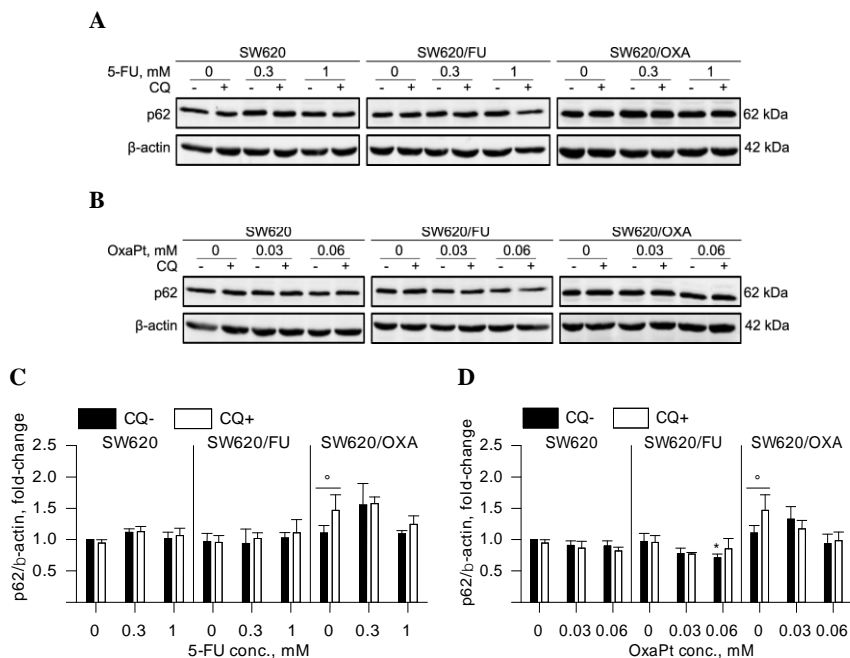


Fig. 15. p62 protein levels in SW620 cells and their sublines. p62 levels were measured 48 h after exposure to 5-FU (A and C) or OxaPt (B and D). To determine autophagic flux, cells were incubated with 30 μ M CQ for 4 h before cell lysis. Data presented as mean \pm SD, $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-treated and untreated cells (*); cells with and without CQ ($^{\circ}$). $^*/^{\circ}$ indicate that $p \leq 0.05$.

The changes in p62 protein levels suggest that: 1) compared to the parental lines, HCT116/FU cells showed an increase in p62 levels, while SW620/OXA cells showed an increase in autophagic flux; 2) 5-FU exposure reduced p62 levels in HCT116 cells, while OxaPt decreased it in HCT116, HCT116/FU and SW620/FU cells; 3) OxaPt treatment increased autophagic flux (based on p62) in HCT116 and HCT116/OXA cells, while in SW620/OXA cells 5-FU and OxaPt treatment decreased it.

Role of p62 in the resistance of HCT116 cells and their sublines

We chose HCT116 cells and their sublines for further studies, as we found elevated p62 levels in the HCT116/FU cells. To determine the role of p62 in resistance, we evaluated the effect of p62 expression silencing on cell

viability. We assessed it by CV and MTT. We reduced p62 expression with siRNA specific for the *SQSTM1* transcript, which was 100 % effective at the protein level 48 h after transfection in all cell lines (Fig. 16).

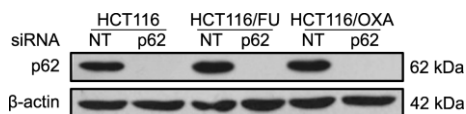


Fig. 16. The efficiency of the p62 expression silencing in HCT116 cells and their sublines. p62 levels were measured 48 h after transfection. NT – a mixture of non-specific siRNAs; p62 – siRNA specific for *SQSTM1* transcript.

The CV method, which reflects the number of cells adhering to the growth surface, showed that silencing of p62 expression reduced the viability of control cells and made them more sensitive to drug treatment (Fig. 17A). The viability of control HCT116 cells decreased by 16 % ($p < 0.001$), HCT116/FU by 10 % ($p = 0.01$) and HCT116/OXA by 8 % ($p < 0.001$). In HCT116 cells, silencing of p62 expression reduced viability after doses of 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU by 13 % ($p < 0.001$) and 8 % ($p = 0.03$), respectively. In these cells, viability was also reduced by 14 % ($p = 0.01$) after a dose of 0.03 mM OxaPt. Silencing of p62 expression made HCT116/FU cells more sensitive to 0.1 mM 5-FU and 0.03 mM OxaPt. Viability decreased by 13 % ($p < 0.001$) and 9 % ($p = 0.01$), respectively. HCT116/OXA cell viability decreased after silencing of p62 expression by 9 % at doses of 0.1 mM and 0.3 mM 5-FU ($p < 0.001$ and 0.01, respectively) and by 11 % at doses of 0.03 mM and 0.06 mM OxaPt ($p = 0.009$ for both cases).

By measuring viability using the MTT assay, which measures the activity of mitochondrial oxidoreductases (hereafter metabolic activity), we found that silencing of p62 expression increased the metabolic activity of drug-resistant cells (Fig. 17B). Silencing of p62 expression increased the metabolic activity of untreated HCT116/FU cells by 14 % ($p = 0.005$), whereas at doses of 0.1 mM 5-FU and 0.06 mM OxaPt increased it by 16 % ($p < 0.001$) and 15 % ($p = 0.003$), respectively. In HCT116/OXA cells, metabolic activity increased by 17 % at 0.1 mM 5-FU ($p = 0.03$), 15 % at 0.03 mM ($p = 0.002$), and 11 % at 0.06 mM ($p = 0.03$) OxaPt exposure.

As we obtained different results in resistant sublines when measuring cell viability by CV and MTT, we evaluated the effect of silencing of p62 expression on cell survival by counting the number of cells (Suppl. 6, Fig. 2). We found that silencing of p62 expression reduced the number of control HCT116 and HCT116/FU cells by 20 % ($p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively) and the number of HCT116/OXA cells by 24 % ($p < 0.001$).

The assessment of viability after silencing of p62 expression suggested that 1) it reduced the viability of control and 5-FU or OxaPt-treated HCT116 cells and their sublines; 2) silencing of p62 expression increased the metabolic activity of HCT116/FU and HCT116/OXA cells.

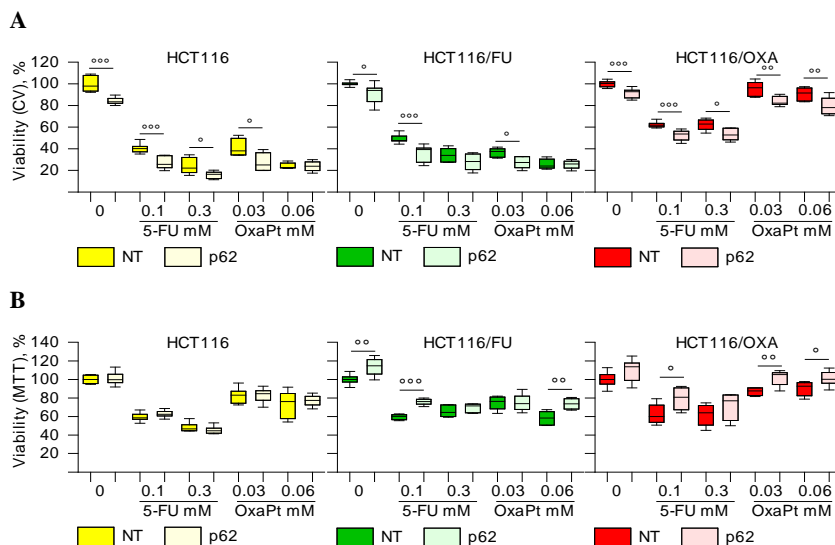


Fig. 17. Role of p62 for 5-FU and OxaPt-induced resistance in HCT116 cells and their sublines. Cell viability was measured by CV (A) or MTT (B) 72 h after transfection (48 h after drug exposure). NT – a mixture of non-specific siRNAs; p62 – a *SQSTM1* transcript-specific siRNA. Data presented as median with interquartile ranges; $n \geq 3$. ° shows a statistically significant difference between cells treated with NT and p62 siRNAs. °/°/° indicate that $p \leq 0.05/0.01/0.001$.

Role of p62 on survival regulatory protein levels

To investigate whether silencing of p62 expression leads to cell death, we assessed the levels of RIPK1, phosphorylated RIPK3 (pRIPK3) and active caspase-3 after p62 downregulation. For this, we chose doses of 0.1 mM 5-FU and 0.06 mM OxaPt, which, when applied to resistant cells, silencing of p62 expression increases metabolic activity. It is known that caspase-8 or RIPK1, may be involved in the regulation of both apoptosis and necroptosis (Shalini *et al.*, 2015). These proteins can form complexes with p62 and regulate cell death and survival (J. Chen *et al.*, 2019).

RIPK1 forms a complex with p62 (Xu *et al.*, 2021) and interacts with many other proteins, including regulators of cell death such as RIPK3, caspase-8, CFLAR, FAS, TRAF2, TRADD or FADD (Suppl. 6, Fig. 3). First, we assessed changes in RIPK1 levels after drug exposure. In HCT116 cells, 5-FU reduced RIPK1 levels by 2.6-fold and OxaPt – by 1.7-fold (in both cases

$p < 0.001$). In HCT116/FU cells, RIPK1 levels were reduced 1.3-fold by 5-FU ($p = 0.03$) and 2.4-fold by OxaPt ($p < 0.001$). In contrast to HCT116 and HCT116/FU cells, 5-FU and OxaPt treatment increased RIPK1 levels in HCT116/OXA cells by 1.5 ($p = 0.04$) and 2-fold ($p = 0.02$), respectively (black bars in Fig. 18).

Downregulation of p62 expression decreased RIPK1 levels in all cell lines. In untreated HCT116 cells, RIPK1 levels decreased by 2-fold, after 5-FU treatment by 4-fold and after OxaPt – 5-fold (in all cases $p < 0.001$). In untreated HCT116/FU cells RIPK1 levels decreased by 1.8-fold, after 5-FU treatment by 3.4-fold ($p < 0.001$ in both cases) and after OxaPt – 9.1-fold ($p = 0.003$). In untreated HCT116/OXA cells, RIPK1 levels decreased by 1.4-fold ($p = 0.03$), after 5-FU treatment by 2.5-fold ($p = 0.007$), and after OxaPt – 4.2-fold ($p < 0.001$) (black bars versus white bars in Fig. 18).

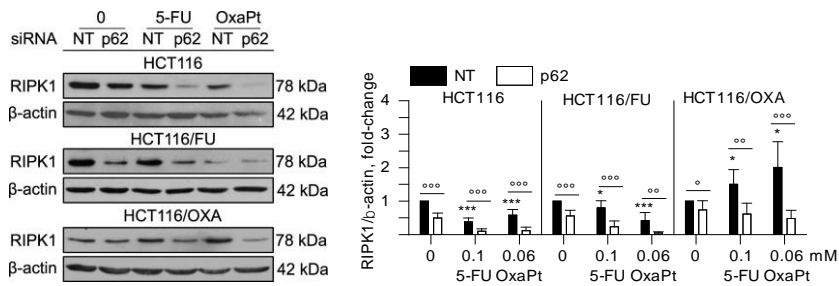


Fig. 18. RIPK1 protein levels after silencing of p62 expression in HCT116 cells and their sublines. RIPK1 levels were measured 72 h after transfection (48 h after drug exposure). NT – a mixture of non-specific siRNAs; p62 – a *SQSTM1* transcript-specific siRNA. Data presented as mean + SD; $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-treated and untreated cells (*); NT and p62 siRNAs (°). */° indicate that $p \leq 0.05$; °° – $p \leq 0.01$; ***/°°° – $p \leq 0.001$.

Since RIPK1 levels were p62-dependent, we further assessed the effect of p62 expression downregulation on the levels of the necroptosis-relevant RIPK3. RIPK1 interacts with RIPK3 via the RHIM domain and induce auto or trans-phosphorylation to activate it (Karlowitz, van Wijk, 2023). In this study, we evaluated a phosphorylated form of RIPK3 (pRIPK3) involved in necroptosis (Ser227) (Dhuriya, Sharma, 2018). We found that in HCT116 cells, exposure to 5-FU reduced pRIPK3 levels by 1.4-fold ($p = 0.03$). In HCT116/FU cells, pRIPK3 levels decreased after 5-FU and OxaPt treatment by 1.2-fold ($p = 0.007$) and 3-fold ($p < 0.001$), respectively. In HCT116/OXA cells, pRIPK3 levels increased by 2-fold after OxaPt treatment ($p < 0.001$) (black bars in Fig. 19).

Silencing of p62 expression resulted in a 2.1-fold ($p = 0.008$) reduction of pRIPK3 levels in HCT116/FU cells after 5-FU treatment and a 2.2-fold

($p < 0.001$) in HCT116/OXA cells after OxaPt treatment (black bars versus white bars in Fig. 19).

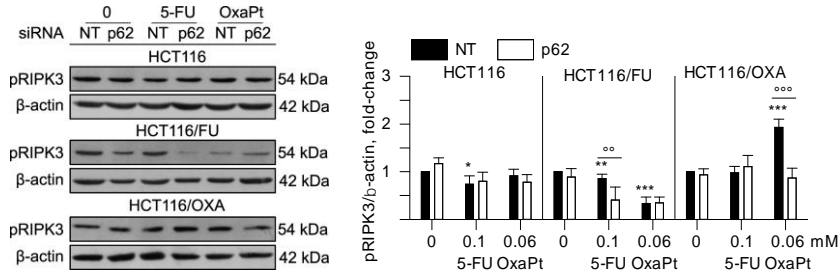


Fig. 19. pRIPK3 levels after silencing of p62 expression in HCT116 cells and their sublines. pRIPK3 levels were measured 72 h after transfection (48 h after drug exposure). NT – a mixture of non-specific siRNAs; p62 – a *SQSTM1* transcript-specific siRNA. Data presented as mean + SD; $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-treated and untreated cells (*); NT and p62 siRNAs ($^{\circ}$). * indicates that $p \leq 0.05$; **/ $^{\circ}$ – $p \leq 0.01$; ***/ $^{\circ}$ – $p \leq 0.001$.

Finally, we assessed the effects of p62 silencing on the levels of active caspase-3 involved in apoptosis. We found that 5-FU and OxaPt treatment activated caspase-3 in HCT116 and HCT116/FU and silencing of p62 expression reduced it. In HCT116 cells, in the presence of 5-FU, caspase-3 activity was reduced by 2.6-fold and in HCT116/FU cells, in the presence of either 5-FU or OxaPt caspase-3 activity decreased 2.7-fold and 3.5-fold, respectively ($p < 0.001$ in all cases) (black bars versus white bars in Fig. 20).

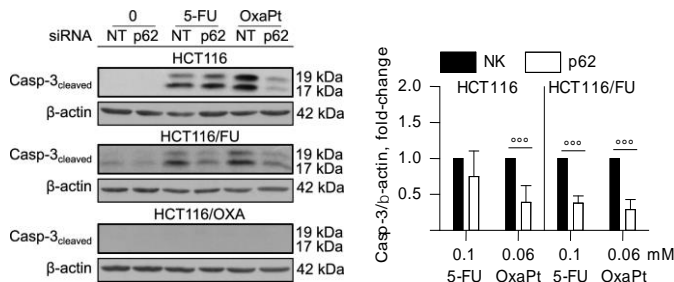


Fig. 20. Active (cleaved) caspase-3 levels after silencing of p62 expression in HCT116 cells and their sublines. Caspase-3 levels were measured 72 h after transfection (48 h after drug exposure). NT – a mixture of non-specific siRNAs; p62 – a *SQSTM1* transcript-specific siRNA. Data presented as mean + SD; $n \geq 3$. A statistically significant difference between cells treated with NT and p62 siRNAs ($^{\circ}$). $^{\circ}$ indicates that $p \leq 0.001$.

Taken together, the results implied that 1) silencing of p62 expression decreased levels of RIPK1 in control and 5-FU or OxaPt treated HCT116 cells and their sublines; 2) pRIPK3 levels decreased after silencing of p62 expression in HCT116/FU cells after 5-FU and in HCT116/OXA cells after

OxaPt treatment; 3) silencing of p62 expression decreased caspase-3 activity in 5-FU or OxaPt treated HCT116 and HCT116/FU cells.

p62 impact on cytokine levels

Since silencing of p62 reduced the levels of death-inducing proteins, which is contrary to the viability results, we further evaluated the effect of silencing of p62 expression on the levels of cytokines that regulate cell proliferation. We selected genes known to have increased expression in chemoresistant cell lines (Fig. 4). We found that silencing of p62 expression reduced *IL1A* transcript levels in all cell lines. In HCT116 cells, it was reduced by 3.6-fold, in HCT116/FU by 3.2-fold and in HCT116/OXA by 2-fold. *IL6* levels decreased only in the parental HCT116 cells by 2.4-fold. *CXCL8* levels decreased in resistant sublines: 3.9-fold in HCT116/FU and 2.9-fold in HCT116/OXA cells. The expression of the cytokine receptor *CXCR2* was reduced in all cells: 5.2-fold in HCT116, 4.6-fold in HCT116/FU and 2.3-fold in HCT116/OXA (Fig. 21).

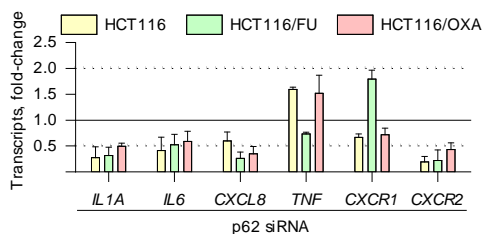


Fig. 21. Cytokine transcript levels after silencing of p62 expression in HCT116 cells and their sublines. qPCR was performed 48 h after siRNA transfection. Transcript levels were normalised to the *HPRT* reference gene. Changes were counted from cells treated with a mixture of non-specific siRNAs (solid line). Dashed lines indicate a biologically significant change. Data presented as mean + SD, n = 3.

Since silencing of p62 expression reduced *CXCL8* levels in resistant sublines, we further assessed the levels of the protein it encodes (IL8). IL8 is a secreted protein, so we determined its levels in a growth medium. We exposed cells to 0.1 mM 5-FU and 0.06 mM OxaPt. First, we assessed the effects of 5-FU or OxaPt on IL8 levels (Fig. 22). We found that in HCT116 and HCT116/FU cells, 5-FU treatment reduced IL8 levels. Median decreased by 1.9-fold ($p = 0.02$) and 1.4-fold ($p = 0.049$) (yellow and green boxes), respectively. In HCT116/OXA cells, 5-FU treatment increased IL8 secretion 3.4-fold ($p < 0.001$) (red box). In HCT116/FU cells, OxaPt treatment increased IL8 levels by 1.3-fold ($p = 0.02$). In HCT116/OXA cells, OxaPt increased the amount of IL8 by 1.7-fold ($p < 0.001$).

Silencing of p62 expression led to a decrease in IL8 levels in all cell lines. In control HCT116 cells, IL8 levels decreased by 6-fold ($p < 0.001$), after 5-FU treatment by 1.8-fold ($p < 0.001$) and after OxaPt – 1.2-fold ($p = 0.009$) (yellow boxes versus light yellow boxes in Fig. 22). In untreated HCT116/FU cells, silencing of p62 expression reduced IL8 levels by 3.6-fold ($p < 0.001$), and by 1.6-fold ($p = 0.002$) after 5-FU treatment (green boxes versus light green boxes in Fig. 22). In untreated HCT116/OXA and with 5-FU-treated cells, IL8 levels decreased by 1.4-fold ($p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively). In these cells, silencing of p62 expression with OxaPt treatment decreased IL8 levels by 1.7-fold ($p = 0.03$) (red boxes versus light red boxes in Fig. 22).

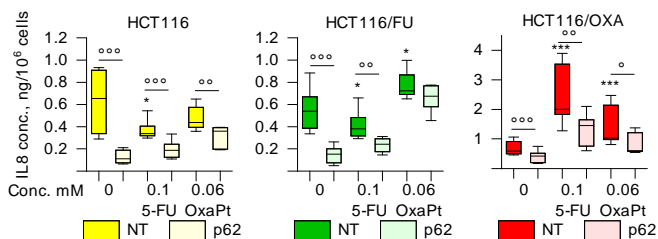


Fig. 22. IL8 protein levels after silencing of p62 expression in HCT116 cells and their sublines. IL8 levels were determined 72 h after transfection (48 h after exposure to 0.1 mM 5-FU or 0.06 mM OxaPt). NT – a mixture of non-specific siRNAs; p62 – a *SQSTM1* transcript-specific siRNA. Data presented as mean + SD; $n \geq 3$. A statistically significant difference between drug-treated and untreated cells (*); NT and p62 siRNAs ($^{\circ}$). */ $^{\circ}$ indicate that $p \leq 0.05$; $^{\circ\circ}$ – $p \leq 0.01$; $^{***}/^{\circ\circ\circ}$ – $p \leq 0.001$.

To summarise the results, we can draw conclusions that silencing of p62 expression decreased 1) cytokine transcript levels in HCT116 cells *IL1A*, *IL6* and *CXCR2*, in HCT116/FU and HCT116/OXA sublines – *IL1A*, *CXCL8* and *CXCR2*; 2) IL8 protein levels in control and 5-FU or OxaPt treated HCT116 cells and their chemoresistant sublines.

DISCUSSION

In this study, we evaluated the molecular mechanisms of resistance to the chemotherapeutic drugs 5-FU and OxaPt in colorectal cancer (CRC) cells. We evaluated changes in cytokine, serpin and autophagy protein levels in CRC cells that have acquired resistance to chemotherapeutic drugs and the role of autophagy in resistance. For experiments, we used resistant sublines derived in our laboratory from HCT116 and SW620 cell lines cultured for prolonged time with 5-FU (HCT116/FU and SW620/FU) or OxaPt (HCT116/OXA and SW620/OXA). These drugs were chosen because, to date, 5-FU alone or in combination with OxaPt and leucovorin (folinic acid) have been the main treatment option for advanced CRC. First, we assessed the level of resistance of the cells used in this work. Evaluation of viability after exposure to 5-FU or OxaPt revealed that SW620 are more resistant to drug treatment than the HCT116. This could be explained by different tumour-promoting mutations in HCT116 and SW620 lines – although both cell lines have a mutated *KRAS* gene, only SW620 cells have a mutated *TP53* (Ahmed *et al.*, 2013). Mutated *TP53* is known to be associated with resistance to chemotherapeutic drugs in CRC (Li *et al.*, 2019). The level of resistance also varied in the derived sublines. SW620/FU and SW620/OXA sublines were less resistant to 5-FU and OxaPt compared to sublines derived from the HCT116. In addition, although the resistance of HCT116/FU, SW620/FU and HCT116/OXA cells was induced by single drug exposure, these sublines acquired resistance to both drugs. Multidrug resistance is often seen in cancers, where cells exposed to a single drug become resistant to other drugs that act through different mechanisms (Bukowski *et al.*, 2020).

To assess the role of autophagy or chosen molecules in the acquired resistance of CRC cells, we chose three strategies: 1) to determine the molecular changes in resistant sublines compared to sensitive cells; 2) to assess the impact of 5-FU and OxaPt on the intensity of autophagy or the levels of selected molecules; and 3) to determine the role of the silencing of the expression of selected targets in the cell viability.

First, we evaluated how the expression of cytokine transcripts changed in HCT116/FU and HCT116/OXA sublines compared to HCT116, and how it was altered after 5-FU and OxaPt treatment. HCT116/FU cells had increased levels of many of tumour-promoting cytokines such as *IL1A*, *IL6*, *IL32*, *CXCL3*, *CXCL4*, *CXCL5*, *CXCL8*, *CXCL10* and *EGF*. These cells also showed changes in the levels of transcripts encoding cytokine receptors: *CXCR1* and *CXCR2* increased while *CXCR4* decreased. HCT116/OXA cells showed altered expression of a smaller fraction of cytokines. *IL6*, *CXCL1*, *CXCL11*,

CXCR1 and *CXCR4* levels increased in these cells, while *IL7* and *CXCR2* decreased. It has been shown that cytokines play an important role in the development of acquired resistance by regulating apoptosis, the NF- κ B signalling pathway, the expression of other cytokines, autophagy, or the amount of drug efflux transporters (Table 1.2). *IL6* and *IL8* have been shown to increase levels of the drug efflux carrier *ABCC1* (Shi *et al.*, 2012), which is associated with 5-FU and OxaPt-induced resistance in CRC cells (Cao *et al.*, 2017). Also, *IL8* may regulate the NF- κ B signalling pathway, which is implicated in 5-FU resistance (Korber *et al.*, 2016) and it is shown that blocking the *IL8* receptor *CXCR2* in 5-FU-resistant CRC cells reduces cell viability (Dabkeviciene *et al.*, 2015). Phosphorylated EGFR (Tyr1068), levels of which are elevated in HCT116/FU and HCT116/OXA sublines (unpublished data), is associated with resistance to 5-FU and OxaPt (Qian *et al.*, 2019). All this suggests that cytokines and their receptors could be potential determinants of resistance to 5-FU and OxaPt. We further evaluated the role of 5-FU and OxaPt on the expression of cytokines and their receptor transcripts. To date, there is little knowledge about changes in cytokine expression in cancer cells after exposure to chemotherapeutic drugs (Groysman *et al.*, 2021), even less is known about their expression in drug resistant cancer cells. In this study, we found that in HCT116 cells, exposure to both 5-FU and OxaPt significantly increased the expression of *IL1A*, *IL6*, *IL32*, *CXCL8*, *CXCR1*, *CXCR2* and *CXCR4*, while the response of HCT116/FU and HCT116/OXA cells was drug dependent. In HCT116/FU cells, OxaPt increased their levels to a greater extent, whereas in HCT116/OXA cells, expression of cytokines increased more after 5-FU treatment. Thus, the drug used to generate a particular subline does not cause an increase in cytokine expression. Changes in cytokine expression may be the cell's response to drug-induced stress to which it is not adapted. Increasing cytokine expression may also be a way for cells to protect themselves against drug-induced cytotoxicity. Some cytokines are known to promote the anti-cancer properties of drugs, while others are known to induce cancer cell proliferation, metastasis, and resistance. Increased expression of interleukins and chemokines after drug exposure tends to stimulate proliferation and have a positive effect on tumour progression (Groysman *et al.*, 2021).

By assessing the expression of serpin transcripts in HCT116 and SW620 cells and their sublines, we found that *SERPINB5* transcript levels increased in HCT116/FU cells and decreased in SW620/FU, while 5-FU and OxaPt treatment increased its levels in all cells except the HCT116/OXA subline. We therefore determined serpin B5 (SB5) protein levels and found that HCT116/FU, HCT116/OXA and SW620/OXA cells showed an increase in

the levels of SB5 in the cytoplasm compared to their parental lines, while SW620/FU cells showed a decrease. There are no data on the impact of SB5 on resistance, but it is known to be upregulated in CRC cells compared to healthy cells (Chang *et al.*, 2018). It has been shown that not only the amount of SB5, but also its intracellular localisation affects tumour development and aggressiveness (Gurzu, Jung, 2021). SW620 cells and their sublines have more SB5 in the nucleus than in the cytoplasm, while HCT116 cells and their sublines have more SB5 in the cytoplasm. SB5 localisation in CRC cells is known to depend on microsatellite status (Gurzu, Jung, 2021). In MSS sporadic colorectal adenocarcinomas, including SW620, SB5 nuclear expression is an indicator of high aggressiveness, a high degree of budding and a high degree of dedifferentiation. MSI-positive CRC cells, including HCT116, have higher levels of SB5 in the cytoplasm than in the nucleus (Gurzu, Jung, 2021). Next, we evaluated the effects of 5-FU and OxaPt on SB5 levels. These drugs increased its levels in HCT116 and HCT116/FU cells. In HCT116/OXA cells, SB5 levels increased only after 5-FU treatment. In SW620 cells and their sublines, we detected SB5 not only in the cytoplasm but also in the nucleus. The drugs had different effects on the levels of SB5 in the cytoplasm and nucleus. 5-FU and OxaPt slightly, but significantly, increased SB5 levels in the cytoplasm of SW620 and SW620/FU cells, while in SW620/OXA cells it was only increased by higher doses of OxaPt. Thus, exposure to 5-FU and OxaPt differentially altered SB5 expression in different cell lines. This may be related to the p53 protein inducing *SERPINB5* gene expression (Lin *et al.*, 2019), while the expression of the p53-encoding *TP53* gene is induced by DNA damage caused by 5-FU and OxaPt exposure (Cho *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2016). In HCT116 and HCT116/FU cells, *TP53* is wild-type, while in HCT116/OXA cells, *TP53* has two mutations: Y236C in the DNA-binding domain, and I255T in the p53-aggregating region (unpublished data). In SW620 cells, the *TP53* gene also carries two mutations, R273H in the DNA binding domain and P309S in the nuclear localization sequence (NLS) (Ahmed *et al.*, 2013). Mutations in the DNA-binding domain result in reduced expression of p53-activated genes, including *SB5*. It has been shown that gastric cancer cells having mutations in the DNA binding domain of the *TP53* have lower levels of SB5 than cells harbouring the wild type *TP53* (Gurzu *et al.*, 2020). In cells with a mutated *TP53*, the slightly increased expression of SB5 after treatment with 5-FU or OxaPt may be due to other signalling pathways (Wongnoppavich *et al.*, 2017). The expression of SB5 in the nucleus of SW620 cells and their sublines after 5-FU and OxaPt differed between cell lines and was also dependent on the drug or its dose. SB5 translocation to the nucleus is activated by the EGF-EGFR signalling pathway

(Longhi *et al.*, 2021). Our studies showed that in HCT116 cells and their sublines, the levels of *EGF* and *EGFR* transcripts (Fig. 5) and EGFR activity (unpublished data) varied differently between cells, drug, and its dose. It can be assumed that differential effects of the drugs on the induction of EGF and EGFR expression or the signalling pathway may also lead to differences in the amount of SB5 present in the nucleus.

We further evaluated changes in autophagy in HCT116 and SW620 cells and their sublines (Table 5). The levels of the autophagosome maturation proteins ATG7 and ATG12 differed between resistant sublines compared to parental cell lines. ATG7 protein levels slightly but significantly increased in HCT116/FU and HCT116/OXA cells (Kukcinavičiūtė, 2019) while levels of ATG12 increased in HCT116/OXA cells. We did not detect any changes in the levels of ATG7 and ATG12 in sublines of SW620 cells. ATG7 and ATG12 are involved in autophagosome formation. ATG7 activates ATG8 family proteins (including LC3) and ATG12. This is important for the covalent attachment of ATG8 family proteins to phosphatidylethanolamine (PE), which is part of autophagic membranes (Nakatogawa, 2020). CRC tissues have increased expression of ATG5, ATG7, ATG12 compared to healthy tissue (H. Liu *et al.*, 2022, Scherr *et al.*, 2020). Autophagy has also been found to be activated in other cancer cells with acquired resistance. ATG7 and ATG12-ATG5 conjugate levels were increased in paclitaxel-resistant cervical cancer cells (Peng *et al.*, 2014), ATG5 and ATG7 levels were increased in cisplatin-resistant lung cancer (W. Li *et al.*, 2020) and osteosarcoma (Jiang *et al.*, 2017) cells. Breast cancer cells resistant to 5-FU, docetaxel or doxorubicin showed an increase in ATG5 (C. K. Das *et al.*, 2018), while vincristine-resistant gastric cancer cells showed an increase in ATG12 levels (An *et al.*, 2015).

Next, we assessed the levels of the autophagy protein LC3B-II, which correlates with the number of autophagosomes (Nakatogawa, 2020). Compared to the parental lines, the number of autophagosomes varied differently in resistant sublines. It increased in HCT116/FU and SW620/OXA cells but decreased in HCT116/OXA and SW620/FU. Other authors have found increased levels of autophagosomes in CRC cell sublines resistant to 5-FU (Xian *et al.*, 2020) or OxaPt (Huang *et al.*, 2018) treatment. We also assessed the intensity (flux) of autophagy by changes in LC3B-II and p62 levels when lysosomal degradation is impaired. LC3B-II is incorporated into autophagosome membranes and part of it is degraded in autolysosomes (Klionsky *et al.*, 2021) while p62 is an autophagy substrate that is degraded by autophagy together with its cargo (Ueno, Komatsu, 2020). The autophagic flux (by LC3B-II) also differed between sublines. It decreased in

HCT116/OXA cells but increased in SW620/FU and SW620/OXA sublines. This shows that the intensity of degradation in autophagosomes remained unchanged or slightly decreased in sublines derived from HCT116 cells, while it increased in sublines derived from SW620 cells.

The level of the selective autophagy receptor p62 was increased in HCT116/FU cells compared to the parental line, while SW620/OXA cells showed an increase in autophagic flux based on the level of p62. This means that the degradation rate in SW620/OXA cells is increased. Elevated levels of p62 in CRC patients' cancerous tissues compared to healthy tissue have been found to be associated with a poor healing prognosis (Ren *et al.*, 2014, J. Zhang *et al.*, 2019). According to other authors, the amount of p62 in resistant cells depends on the type of cancer or resistance to a particular drug. In MDR ovarian cancer cells and OxaPt-resistant CRC cells, p62 levels are reduced and autophagic flux is increased (Sun *et al.*, 2020, J. Wang *et al.*, 2018). In cisplatin-resistant gastric cancer cells, p62 levels are also reduced compared to sensitive cells (Miao *et al.*, 2021). Elevated levels of p62 are found in head and neck cancer cells resistant to the anticancer drug RITA (Shin *et al.*, 2017), in OxaPt-resistant liver cancer cells (Ma *et al.*, 2021), and in Hep-2 epithelial cancer cells with triple resistance (Battista *et al.*, 2018).

Table 5. Changes in autophagy protein levels in sublines compared to parental lines.

Protein	HCT116/FU	HCT116/OXA	SW620/FU	SW620/OXA
ATG7	↑*	↑*	-	-
ATG12	-	↑	-	-
LC3B-II	↑*	↓*	↓	↑
Flux _{LC3B-II}	-*	↓*	↑	↑
p62	↑	-	-	-
Flux _{p62}	-	-	-	↑

* For comparison, data taken from E. Kukcinavičiūtė, 2019

Flux – autophagic flux was assessed by LC3-II or p62 levels in the presence or absence of CQ. ↑ – protein levels increase, ↓ – decrease, - - are not statistically significant.

In summary, HCT116/FU and HCT116/OXA cells differ in their autophagy protein levels. In HCT116/FU cells, ATG7, LC3B-II and p62 levels were increased, whereas in HCT116/OXA cells, ATG7 and ATG12 levels were increased, while LC3B-II levels decreased. In these sublines autophagic flux was slightly reduced or unchanged compared to the parental line. This suggests that autophagosomes may be forming, but their degradation is impaired. Although there was no change in ATG7 and ATG12 protein levels in resistant sublines of SW620 cells, these cells showed an

increase in autophagic flux compared to sensitive cells, suggesting that autophagy may play an important role in acquired resistance of these cell lines.

Next, we evaluated how exposure to 5-FU and OxaPt altered autophagy in parental and resistant cells. We found that in HCT116, SW620 cells and their sublines drugs affected autophagy differently (Table 6). In HCT116 cells, 5-FU and OxaPt reduced levels of ATG7, ATG12 and p62, as well as autophagic flux (by LC3B-II). In HCT116/FU cells, both drugs also reduced ATG7, ATG12 levels and autophagic flux (by LC3B-II), while p62 levels were reduced by OxaPt. In HCT116/OXA cells, the effects of these drugs on autophagy differed. 5-FU decreased ATG7, ATG12 levels and autophagic flux (as measured by LC3B-II), while OxaPt increased ATG7 levels and autophagic flux (based by LC3B-II and p62). The level of autophagy of SW620 cells and their sublines was drug dependent. Interestingly, in these cell lines, 5-FU and OxaPt decreased ATG7 levels but increased ATG12, and the autophagic flux was drug dependent. In SW620 and SW620/FU cells, 5-FU inhibited autophagic flux (by LC3B-II), while OxaPt activated it. In SW620/OXA cells, autophagic flux (by LC3B-II and p62) was reduced by both drugs.

Table 6. Changes in autophagy protein levels after exposure to 5-FU and OxaPt.

Protein	HCT116		HCT116/FU		HCT116/OXA	
	5-FU	OxaPt	5-FU	OxaPt	5-FU	OxaPt
ATG7*	↓	↓	↓	↓	↓ _{0.3}	↑
ATG12	↓	↓	↓	↓	↓	-
LC3B-II*	↓ _{0.1}	↓ _{0.03} , ↑ _{0.06}	↓	↓ _{0.03}	↑	↑ _{0.03} , ↓ _{0.06}
Flux _{LC3B-II} *	↓	↓	↓	↓	↓	↑ _{0.06}
p62	↓	↓	-	↓	-	-
Flux _{p62}	-	↑	-	-	-	↑ _{0.03}
Protein	SW620		SW620/FU		SW620/OXA	
ATG7	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ATG12	↑	↑ _{0.06}	↑ ₁	↑ _{0.06}	↑ ₁	↑ _{0.06}
LC3B-II	↑ ₁	-	↑ ₁	-	-	-
Flux _{LC3B-II}	↓ ₁	↑	↓ ₁	↑	↓	↓ _{0.03}
p62	-	-	-	↓ _{0.06}	-	-
Flux _{p62}	-	-	-	-	↓	↓

* For comparison, data taken from E. Kukcinavičiūtė, 2019

Flux – autophagic flux was assessed by LC3-II or p62 protein levels in the presence or absence of CQ. ↑ – protein levels increase, ↓ – decrease; - – are not statistically significant. The numbers next to the arrows indicate the concentrations (in mM) at which the change in protein levels were statistically significant.

The autophagy inhibitory effect of 5-FU was also detected in another CRC cell line SNUC5, and autophagic flux was reduced in the 5-FU resistant

subline compared to the parental cell line (Yao *et al.*, 2017). The effect of OxaPt on autophagic flux was cell type and dose dependent. Activation of autophagy by OxaPt in CRC cells has been associated with resistance (Sun *et al.*, 2020), but there is also evidence that OxaPt may have a negative effect on autophagy in this type of cancer cells (Boo *et al.*, 2022). Differences in the expression of molecules involved in autophagosome biogenesis could be due to molecular changes in the cells, differences in the mechanism of action of the drugs, and complex regulation of the expression of these molecules. In non-small cell lung carcinoma cells, cisplatin has also been shown to downregulate the levels of ATG5, ATG7 and Beclin-1 proteins and the levels of the transcript encoding the transcription factor MiTF, which regulates autophagy protein expression (W. Li *et al.*, 2020). It is known that the expression of *ATG7* and *ATG12* can be regulated at transcriptional and posttranscriptional levels. For example, *ATG7* expression in carboplatin treated breast cancer cells is regulated by the transcription factor HSF1 (Desai *et al.*, 2013). *ATG12* expression in ovarian carcinoma cells depends on the transcription factor NRF2 (Bao *et al.*, 2014), while in pancreatic cancer cells it is dependent on the mRNA splicing protein PTBP3, which is responsible for gemcitabine resistance (Ma *et al.*, 2020). The expression of *ATG7* and *ATG12* may also be regulated by miRNAs, and some miRNAs are associated with resistance to chemotherapeutic drugs. In HCT116 and SW620 cells, *ATG7* is downregulated by miR-106a (Hao *et al.*, 2017), and in hepatocellular carcinoma cells by miR-199a-5p (Xu *et al.*, 2012). In gastric cancer cells, *ATG12* is the target of miR-23b-3p (An *et al.*, 2015), in docetaxel-sensitive and resistant lung adenocarcinoma cells it is the target of miR-200b (Pan *et al.*, 2015), and in dexamethasone-resistant multiple myeloma cells it is the target of miR-221/222 (Xu *et al.*, 2019).

The effects of drugs on p62 levels varied depending on the cell line. 5-FU and OxaPt reduced p62 levels in HCT116 cells, while in SW620 cells were unchanged. These drugs also reduced its levels in DLD1 cells (Zitkute *et al.*, 2023), which, like the HCT116 line, have MSI and CIMP and harbour mutations in the *KRAS* and *PIK3CA* genes (Ahmed *et al.*, 2013). These results are consistent with other studies in which 5-FU and OxaPt reduced p62 levels in CRC cells (He *et al.*, 2020, B. Kumar *et al.*, 2021). In this work, we assessed that OxaPt reduced p62 levels in HCT116/FU cells, which have low resistance to this drug, and SW620/FU subline, which has not acquired resistance to OxaPt. In DLD1/FU cells, which are sensitive to OxaPt, this drug also reduced p62 levels (Zitkute *et al.*, 2023). Thus, p62 levels did not change in sublines with resistance to a particular drug. This indicates that the decrease in p62 levels is associated with sensitivity to the drug.

Several studies have shown that pharmacological or genetic inhibition of autophagy increases the sensitivity of cells to chemotherapeutic drugs (Zamame Ramirez *et al.*, 2021) therefore, in this study we determined the role of autophagy in resistance in HCT116 cells and their sublines. We assessed this by reducing the levels of the autophagy molecules ATG5, ATG7, ATG12 and p62 and measuring cell viability by two methods: staining cells with crystal violet (CV) and measuring mitochondrial oxidoreductase activity by MTT (hereafter metabolic activity). Since OxaPt increased the intensity of autophagy in some cases (5-FU decreased it), we investigated the role of autophagy in OxaPt resistance by reducing the levels of the ATG5, ATG7 and ATG12. We found that silencing of *ATG5* expression reduced the viability of untreated HCT116/FU cells and silencing of *ATG7* expression decreased the viability of untreated HCT116 and HCT116/OXA cells. ATG5 is currently known to be important for survival and resistance in cisplatin resistant lung cancer cells (W. Li *et al.*, 2020) and breast cancer cells which are epirubicin (Chittaranjan *et al.*, 2014) or doxorubicin resistant (C. K. Das *et al.*, 2018). Also it has been shown that reducing ATG7 levels significantly reduces the viability of epirubicin resistant breast cancer cells (Chittaranjan *et al.*, 2014), paclitaxel resistant cervical cancer (Peng *et al.*, 2014) and 5-FU resistant CRC cells (Li *et al.*, 2010). We also found that silencing of ATG12 expression reduced the viability of untreated HCT116 cells and their sublines and increased the sensitivity of HCT116 and HCT116/FU cells to OxaPt. Similarly, to CV, silencing of ATG12 expression decreased the metabolic activity of HCT116 and HCT116/FU cells. Other researchers have shown that ATG12 is also important for drug resistance in other cancer types, including lung cancer cells resistant to docetaxel (Pan *et al.*, 2015), and gastric cancer cells resistant to 5-FU, vincristine and cisplatin (An *et al.*, 2015).

Silencing of p62 expression reduced the number of cells adhering to the growth surface (CV) but increased the metabolic activity of resistant sublines (MTT). MTT is known to be reduced in cells by oxidoreductases, dehydrogenases, and electron donors (mostly NAD(P)H) (Ghasemi *et al.*, 2021). These results suggest that in resistant sublines, p62 is important in regulating the balance of oxidation-reduction reactions, and that silencing of its expression reduces cell number but increases redox activity. Thus, in resistant sublines, p62 promotes cell survival but inhibits redox activity, whereas in sensitive cells it promotes survival. These data show that there is an altered metabolism in resistant sublines compared to parental line. Other studies have identified metabolic reprogramming as one of the hallmarks of resistance to chemotherapeutic drugs (Chen *et al.*, 2020).

The importance of p62 for cell viability prompted us to analyse which molecular mechanisms regulating cell survival via p62 could be relevant for 5-FU and OxaPt-induced resistance. After silencing of p62 expression, we assessed the amount of RIPK1 which directly interacts with p62. It is known that RIPK1 can be activated by a variety of signals induced by stressors or by activation of immune receptors TLR or TNFR. These signalling pathways regulate the expression of survival, cell death and inflammatory genes (Newton, 2020). RIPK1 can act in two ways – as a structural component to protect from cell death, or as a kinase, which, in contrast, induces death (Delanghe *et al.*, 2020). RIPK1 as a structural component can activate NF- κ B or MAPK signalling pathways, the activation of which leads to the expression of various inflammatory and survival-promoting genes. RIPK1 as a structural component may also protect the cell from apoptosis or necroptosis. However, RIPK1, acting as a kinase, can initiate apoptosis or necroptosis depending on the conditions (Delanghe *et al.*, 2020, Newton, 2020). Silencing of p62 expression reduced RIPK1 levels in control, 5-FU and OxaPt-treated HCT116 cells and their sublines. Interestingly, the drugs decreased RIPK1 levels in HCT116 and HCT116/FU cells but increased it in HCT116/OXA cells. This suggests that RIPK1 has different functions in the resistant sublines. It is known that RIPK1 can interact with RIPK3 and induce its auto and trans-phosphorylation (Karlowitz, van Wijk, 2023), and activated RIPK3 can induce necroptosis or apoptosis (Tummers, Green, 2022), although inhibition of RIPK3 with GSK843 in our cells did not alter the cellular response to exposure to 5-FU or OxaPt. Next, we evaluated the effects of silencing of p62 expression on the levels of phosphorylated RIPK3 (Ser227) (pRIPK3) which is important for necroptosis. pRIPK3 levels decreased after silencing of p62 expression in HCT116/FU cells after 5-FU treatment and in HCT116/OXA cells after OxaPt treatment. RIPK1 may be associated not only with necroptosis but also with cell survival. It has been shown that DNA damage in CRC cells leads to ubiquitylation of RIPK1, which activates the NF- κ B signalling pathway and results in cancer cell survival and proliferation (Sheng *et al.*, 2017). Studies have shown that upregulation of RIPK1 and RIPK3 expression can promote CRC cell proliferation, survival, and cytokine expression (Z. Y. Liu *et al.*, 2019, Zeng *et al.*, 2018). There is also evidence that RIPK1 and RIPK3 levels are reduced in CRC cells compared to healthy tissue, leading to further development of CRC (Bozec *et al.*, 2016, Moriwaki *et al.*, 2015). There is currently no knowledge of the impact of RIPK1 and RIPK3 on CRC cell resistance, but it is known that a decrease in RIPK3 leads to cisplatin resistance in laryngeal squamous cell carcinoma cells (Sun *et al.*, 2018). We also evaluated the role of p62 in caspase-3 activity and apoptosis.

Silencing of p62 expression reduced caspase-3 activity in HCT116 and HCT116/FU cells and did not change the number of dead cells. This was consistent with results obtained by other researchers, where caspase-3, 8 and 9 activities decreased after silencing of p62 expression (Huang *et al.*, 2011, Huang *et al.*, 2013).

Since p62 downregulation did not induce cell death, it remains unclear why cell viability decreased after silencing of p62 expression. This prompted us to evaluate the effect of p62 on the levels of pro-survival cytokines. In this work, we found that silencing of p62 expression decreased the levels of *CXCL8* transcript and the IL8 protein it codes. The expression of the *CXCL8* gene is known to be regulated by NF- κ B (Park, Hong, 2016). Studies have shown that p62 can activate, either directly through its TB domain or via RIPK1 NF- κ B signalling pathway and thereby induce *CXCL8* gene expression (Kumar *et al.*, 2022).

Thus, based on our data, we can assume that 5-FU-induced resistance, compared to OxaPt, increases the expression of a higher proportion of cytokine transcripts levels. Serpin B5 levels increases in the resistant sublines of CRC cells and 5-FU or OxaPt treatment increases its levels in parental cells and sublines derived from cultivating with 5-FU. We found that the levels of ATG7 and ATG12 proteins and the intensity of autophagy in CRC cells and their resistant sublines after treatment with 5-FU or OxaPt are cell line dependent. In addition, ATG12 is important for the survival of HCT116 cells and their resistant sublines and for the resistance of HCT116 and HCT116/FU cells to OxaPt. The p62 protein levels are upregulated in HCT116/FU cells. p62 is important for the survival and resistance to 5-FU and OxaPt of HCT116 cells and their sublines, as it promotes cytokine expression.

CONCLUSIONS

- HCT116/FU cells have higher levels of cytokine transcripts than HCT116/OXA, whereas 5-FU and OxaPt increase cytokine transcript levels in cells not adapted to drug treatment;
- Serpin B5 levels are increased in resistant CRC cells, while 5-FU and OxaPt increase its levels in HCT116, SW620 cells and their sublines derived with 5-FU;
- ATG12 levels are increased in HCT116/OXA cells, whereas 5-FU and OxaPt treatment decreases its levels in HCT116 cells and their sublines but increases in SW620 in cells and their sublines;
- ATG12 is important for the survival of HCT116 cells and their sublines and silencing of its expression increases the sensitivity of HCT116 and HCT116/FU cells to OxaPt;
- p62 levels increase in HCT116/FU cells, and the decrease in its levels after exposure to 5-FU and OxaPt correlates with drug sensitivity in colorectal cancer cells and their sublines;
- p62 regulates IL8 expression and promotes survival and resistance to 5-FU and OxaPt of HCT116 cells and their sublines.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abdulla MH, Shaik AS, Vaali-Mohammed MA, Al Khayal KA, Traiki TB, Zubaidi AM, Al-Johani T, Shakoor Z, Al-Obeed OA. Expression of VEGF, EGF and HGF in early- and late-stage colorectal cancer. *Mol Clin Oncol*. 2021;15. 251. doi: 10.3892/mco.2021.2413.
2. Aghabozorgi AS, Bahreyni A, Soleimani A, Bahrami A, Khazaei M, Ferns GA, Avan A, Hassanian SM. Role of adenomatous polyposis coli (APC) gene mutations in the pathogenesis of colorectal cancer; current status and perspectives. *Biochimie*. 2019;157. 64-71. doi: 10.1016/j.biochi.2018.11.003.
3. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2. e71. doi: 10.1038/oncsis.2013.35.
4. Al Obeed OA, Alkhalaf KA, Al Sheikh A, Zubaidi AM, Vaali-Mohammed MA, Boushey R, McKerrow JH, Abdulla MH. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha is associated with advanced colorectal cancer stages. *World J Gastroenterol*. 2014;20. 18390-18396. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18390.
5. Altan-Bonnet G, Mukherjee R. Cytokine-mediated communication: a quantitative appraisal of immune complexity. *Nat Rev Immunol*. 2019;19. 205-217. doi: 10.1038/s41577-019-0131-x.
6. An Y, Zhang Z, Shang Y, Jiang X, Dong J, Yu P, Nie Y, Zhao Q. miR-23b-3p regulates the chemoresistance of gastric cancer cells by targeting ATG12 and HMGB2. *Cell Death Dis*. 2015;6. e1766. doi: 10.1038/cddis.2015.123.
7. Askew DJ, Silverman GA. Intracellular and extracellular serpins modulate lung disease. *J Perinatol*. 2008;28 Suppl 3. S127-135. doi: 10.1038/jp.2008.150.
8. Baniyas L, Jung I, Gurzu S. Subcellular expression of maspin – from normal tissue to tumor cells. *World Journal of Meta-Analysis*. 2019;7. 120-183. doi: 10.13105/wjma.v7.i4.142.
9. Bao LJ, Jaramillo MC, Zhang ZB, Zheng YX, Yao M, Zhang DD, Yi XF. Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7. 1502-1513. doi: does not have.
10. Bartsch K, Knittler K, Borowski C, Rudnik S, Damme M, Aden K, Spehlmann ME, Frey N, Saftig P, Chalaris A, et al. Absence of RNase H2 triggers generation of immunogenic micronuclei removed by autophagy. *Hum Mol Genet*. 2017;26. 3960-3972. doi: 10.1093/hmg/ddx283.
11. Battista RA, Resnati M, Facchi C, Ruggieri E, Cremasco F, Paradiso F, Orfanelli U, Giordano L, Bussi M, Cenci S, et al. Autophagy mediates epithelial cancer chemoresistance by reducing p62/SQSTM1 accumulation. *PLoS One*. 2018;13. e0201621. doi: 10.1371/journal.pone.0201621.
12. Bazzichetto C, Milella M, Zampiva I, Simionato F, Amoreo CA, Buglioni S, Pacelli C, Le Pera L, Colombo T, Bria E, et al. Interleukin-8 in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Its Potential Role as a Prognostic Biomarker. *Biomedicines*. 2022;10. doi: 10.3390/biomedicines10102631.
13. Bednarz-Misa I, Diakowska D, Krzystek-Korpacka M. Local and Systemic IL-7 Concentration in Gastrointestinal-Tract Cancers. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55. doi: 10.3390/medicina55060262.
14. Beese CJ, Brynjolfsdottir SH, Frankel LB. Selective Autophagy of the Protein Homeostasis Machinery: Ribophagy, Proteaphagy and ER-Phagy. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7. 373. doi: 10.3389/fcell.2019.00373.
15. Bergeron S, Lemieux E, Durand V, Cagnol S, Carrier JC, Lussier JG, Boucher MJ, Rivard N. The serine protease inhibitor serpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. *Mol Cancer*. 2010;9. 271. doi: 10.1186/1476-4598-9-271.
16. Berkamp S, Mostafavi S, Sachse C. Structure and function of p62/SQSTM1 in the emerging framework of phase separation. *FEBS J*. 2021;288. 6927-6941. doi: 10.1111/febs.15672.

17. Bharadwaj AG, Holloway RW, Miller VA, Waisman DM. Plasmin and Plasminogen System in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13. doi: 10.3390/cancers13081838.
18. Biasizzo M, Kopitar-Jerala N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Front Immunol*. 2020;11. 591803. doi: 10.3389/fimmu.2020.591803.
19. Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci*. 2013;126. 3237-3247. doi: 10.1242/jcs.126128.
20. Blohm P, Frishman G, Smialowski P, Goebels F, Wachinger B, Ruepp A, Frishman D. Negatome 2.0: a database of non-interacting proteins derived by literature mining, manual annotation and protein structure analysis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42. D396-400. doi: 10.1093/nar/gkt1079.
21. Blondy S, David V, Verdier M, Mathonnet M, Perraud A, Christou N. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci*. 2020;111. 3142-3154. doi: 10.1111/cas.14532.
22. Bodenshteyn TM, Seftor RE, Khalkhali-Ellis Z, Seftor EA, Pemberton PA, Hendrix MJ. Maspin: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev*. 2012;31. 529-551. doi: 10.1007/s10555-012-9361-0.
23. Boo SJ, Piao MJ, Kang KA, Zhen AX, Fernando P, Herath H, Lee SJ, Song SE, Hyun JW. Comparative Study of Autophagy in Oxaliplatin-Sensitive and Resistant SNU-C5 Colon Cancer Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2022;30. 447-454. doi: 10.4062/biomolther.2022.028.
24. Borowczak J, Szczerbowski K, Maniewski M, Kowalewski A, Janiczek-Polewska M, Szyberg A, Marszałek A, Szyberg L. The Role of Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Colorectal Carcinoma-Recent Findings and Review. *Biomedicines*. 2022;10. doi: 10.3390/biomedicines10071670.
25. Boswell-Casteel RC, Hays FA. Equilibrative nucleoside transporters-A review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2017;36. 7-30. doi: 10.1080/15257770.2016.1210805.
26. Boudny M, Trbusek M. ATR-CHK1 pathway as a therapeutic target for acute and chronic leukemias. *Cancer Treat Rev*. 2020;88. 102026. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102026.
27. Bozec D, Iuga AC, Roda G, Dahan S, Yeretssian G. Critical function of the necroptosis adaptor RIPK3 in protecting from intestinal tumorigenesis. *Oncotarget*. 2016;7. 46384-46400. doi: 10.18632/oncotarget.10135.
28. Braumuller H, Mauerer B, Andris J, Berlin C, Wieder T, Kesselring R. The Cytokine Network in Colorectal Cancer: Implications for New Treatment Strategies. *Cells*. 2022;12. doi: 10.3390/cells12010138.
29. Bryant KL, Stalneck CA, Zeitouni D, Klomp JE, Peng S, Tikunov AP, Gunda V, Pierobon M, Waters AM, George SD, et al. Author Correction: Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nat Med*. 2020;26. 982. doi: 10.1038/s41591-020-0947-8.
30. Briukhovetska D, Dorr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer*. 2021;21. 481-499. doi: 10.1038/s41568-021-00363-z.
31. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol*. 2016;16. 407-420. doi: 10.1038/nri.2016.58.
32. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi: 10.3390/ijms21093233.
33. Buss I, Hamacher A, Sarin N, Kassack MU, Kalayda GV. Relevance of copper transporter 1 and organic cation transporters 1-3 for oxaliplatin uptake and drug resistance in colorectal cancer cells. *Metallomics*. 2018;10. 414-425. doi: 10.1039/c7mt00334j.
34. Cacev T, Radosevic S, Krizanac S, Kapitanovic S. Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. *Carcinogenesis*. 2008;29. 1572-1580. doi: 10.1093/carcin/bgn164.
35. Cao D, Qin S, Mu Y, Zhong M. The role of MRP1 in the multidrug resistance of colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2017;13. 2471-2476. doi: 10.3892/ol.2017.5741.
36. Cao H, Zhang J, Liu H, Wan L, Zhang H, Huang Q, Xu E, Lai M. IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7. 61183-61198. doi: 10.18632/oncotarget.11282.

37. Carroll B, Otten EG, Manni D, Stefanatos R, Menzies FM, Smith GR, Jurk D, Kenneth N, Wilkinson S, Passos JF, *et al.* Oxidation of SQSTM1/p62 mediates the link between redox state and protein homeostasis. *Nat Commun.* 2018;9. 256. doi: 10.1038/s41467-017-02746-z.
38. Causse SZ, Marcion G, Chanteloup G, Uyanik B, Boudesco C, Grigorash BB, Douhard R, Dias AMM, Dumetier B, Dondaine L, *et al.* HSP110 translocates to the nucleus upon genotoxic chemotherapy and promotes DNA repair in colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2019;38. 2767-2777. doi: 10.1038/s41388-018-0616-2.
39. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, Santana-da-Silva MN, Pinto P, Vidal AF, Ribeiro-Dos-Santos A. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi: 10.3390/ijms20174133.
40. Chalabi-Dchar M, Fenouil T, Machon C, Vincent A, Catez F, Marcel V, Mertani HC, Saurin JC, Bouvet P, Guitton J, *et al.* A novel view on an old drug, 5-fluorouracil: an unexpected RNA modifier with intriguing impact on cancer cell fate. *NAR Cancer.* 2021;3. zcab032. doi: 10.1093/narcan/zcab032.
41. Chang HY, Yang WY. Golgi quality control and autophagy. *IUBMB Life.* 2022;74. 361-370. doi: 10.1002/iub.2611.
42. Chang IW, Liu KW, Ragunanan M, He HL, Shiue YL, Yu SC. SERPINB5 Expression: Association with CCRT Response and Prognostic Value in Rectal Cancer. *Int J Med Sci.* 2018;15. 376-384. doi: 10.7150/ijms.22823.
43. Chavez-Dominguez R, Perez-Medina M, Lopez-Gonzalez JS, Galicia-Velasco M, Aguilar-Cazares D. The Double-Edge Sword of Autophagy in Cancer: From Tumor Suppression to Pro-tumor Activity. *Front Oncol.* 2020;10. 578418. doi: 10.3389/fonc.2020.578418.
44. Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020;13. 1057-1073. doi: 10.2147/JIR.S275595.
45. Chen C, Xu ZQ, Zong YP, Ou BC, Shen XH, Feng H, Zheng MH, Zhao JK, Lu AG. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF-kappaB pathway in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2019;10. 178. doi: 10.1038/s41419-019-1431-6.
46. Chen EI, Yates JR. Maspin and tumor metastasis. *IUBMB Life.* 2006;58. 25-29. doi: 10.1080/15216540500531721.
47. Chen H, Peng H, Liu W, Sun Y, Su N, Tang W, Zhang X, Wang J, Cui L, Hu P, *et al.* Silencing of plasminogen activator inhibitor-1 suppresses colorectal cancer progression and liver metastasis. *Surgery.* 2015;158. 1704-1713. doi: 10.1016/j.surg.2015.04.053.
48. Chen J, Kos R, Garssen J, Redegeld F. Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis: The Necrosome As a Potential Therapeutic Target. *Cells.* 2019;8. doi: 10.3390/cells8121486.
49. Chen L, Yang F, Chen S, Tai J. Mechanisms on chemotherapy resistance of colorectal cancer stem cells and research progress of reverse transformation: A mini-review. *Front Med (Lausanne).* 2022;9. 995882. doi: 10.3389/fmed.2022.995882.
50. Chen Q, Meng F, Wang L, Mao Y, Zhou H, Hua D, Zhang H, Wang W. A polymorphism in ABCC4 is related to efficacy of 5-FU/capecitabine-based chemotherapy in colorectal cancer patients. *Sci Rep.* 2017;7. 7059. doi: 10.1038/s41598-017-07491-3.
51. Chen X, Chen S, Yu D. Metabolic Reprogramming of Chemoresistant Cancer Cells and the Potential Significance of Metabolic Regulation in the Reversal of Cancer Chemoresistance. *Metabolites.* 2020;10. doi: 10.3390/metabo10070289.
52. Cheng KJ, Mejia Mohammed EH, Khong TL, Mohd Zain S, Thavagnanam S, Ibrahim ZA. IL-1alpha and colorectal cancer pathogenesis: Enthralling candidate for anti-cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;163. 103398. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103398.
53. Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, Xu J, Abeyundara N, Leung A, Go NE, DeVorkin L, Wepler SA, Gelmon K, *et al.* Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2014;20. 3159-3173. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2060.
54. Cho YH, Ro EJ, Yoon JS, Mizutani T, Kang DW, Park JC, Il Kim T, Clevers H, Choi KY. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/beta-catenin pathway activation. *Nat Commun.* 2020;11. 5321. doi: 10.1038/s41467-020-19173-2.

55. Choi YJ, Kim S, Choi Y, Nielsen TB, Yan J, Lu A, Ruan J, Lee HR, Wu H, Spellberg B, *et al.* SERPINB1-mediated checkpoint of inflammatory caspase activation. *Nat Immunol.* 2019;20. 276-287. doi: 10.1038/s41590-018-0303-z.
56. Collaud S, Tischler V, Atanassoff A, Wiedl T, Komminoth P, Oehlschlegel C, Weder W, Soltermann A. Lung neuroendocrine tumors: correlation of ubiquitinylation and sumoylation with nucleo-cytosolic partitioning of PTEN. *BMC Cancer.* 2015;15. 74. doi: 10.1186/s12885-015-1084-5.
57. Condon KJ, Sabatini DM. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci.* 2019;132. doi: 10.1242/jcs.222570.
58. Cui C, Zhang R, Gu F, Pei Y, Sun L, Huang Y, Niu G, Li J. Plasma CXCL3 Levels Are Associated with Tumor Progression and an Unfavorable Colorectal Cancer Prognosis. *J Immunol Res.* 2022;2022. 1336509. doi: 10.1155/2022/1336509.
59. Cui G, Goll R, Olsen T, Steigen SE, Husebekk A, Vonen B, Florholmen J. Reduced expression of microenvironmental Th1 cytokines accompanies adenomas-carcinomas sequence of colorectum. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56. 985-995. doi: 10.1007/s00262-006-0259-y.
60. Dabkeviciene D, Jonusiene V, Zitkute V, Zalyte E, Grigaitis P, Kirvelienu V, Sasnauskiene A. The role of interleukin-8 (CXCL8) and CXCR2 in acquired chemoresistance of human colorectal carcinoma cells HCT116. *Med Oncol.* 2015;32. 258. doi: 10.1007/s12032-015-0703-y.
61. Das CK, Linder B, Bonn F, Rothweiler F, Dikic I, Michaelis M, Cinatl J, Mandal M, Kogel D. BAG3 Overexpression and Cytoprotective Autophagy Mediate Apoptosis Resistance in Chemoresistant Breast Cancer Cells. *Neoplasia.* 2018;20. 263-279. doi: 10.1016/j.neo.2018.01.001.
62. Das T, Chen Z, Hendriks RW, Kool M. A20/Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Protein 3 in Immune Cells Controls Development of Autoinflammation and Autoimmunity: Lessons from Mouse Models. *Front Immunol.* 2018;9. 104. doi: 10.3389/fimmu.2018.00104.
63. De Las Rivas J, Brozovic A, Izraely S, Casas-Pais A, Witz IP, Figueroa A. Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies. *Arch Toxicol.* 2021;95. 2279-2297. doi: 10.1007/s00204-021-03063-7.
64. Dedeurwaerdere F, Claes KB, Van Dorpe J, Rottiers I, Van der Meulen J, Breyne J, Swaerts K, Martens G. Comparison of microsatellite instability detection by immunohistochemistry and molecular techniques in colorectal and endometrial cancer. *Sci Rep.* 2021;11. 12880. doi: 10.1038/s41598-021-91974-x.
65. Delanghe T, Dondelinger Y, Bertrand MJM. RIPK1 Kinase-Dependent Death: A Symphony of Phosphorylation Events. *Trends Cell Biol.* 2020;30. 189-200. doi: 10.1016/j.tcb.2019.12.009.
66. Deng S, Deng Q, Zhang Y, Ye H, Yu X, Zhang Y, Han GY, Luo P, Wu M, Yu Y, *et al.* Non-platelet-derived CXCL4 differentially regulates cytotoxic and regulatory T cells through CXCR3 to suppress the immune response to colon cancer. *Cancer Lett.* 2019;443. 1-12. doi: 10.1016/j.canlet.2018.11.017.
67. Desai S, Liu Z, Yao J, Patel N, Chen J, Wu Y, Ahn EE, Fodstad O, Tan M. Heat shock factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7 (ATG7). *J Biol Chem.* 2013;288. 9165-9176. doi: 10.1074/jbc.M112.422071.
68. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation.* 2018;15. 199. doi: 10.1186/s12974-018-1235-0.
69. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017;17. 268. doi: 10.1038/nrc.2017.24.
70. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19. 349-364. doi: 10.1038/s41580-018-0003-4.
71. Dillon M, Lopez A, Lin E, Sales D, Perets R, Jain P. Progress on Ras/MAPK Signaling Research and Targeting in Blood and Solid Cancers. *Cancers (Basel).* 2021;13. doi: 10.3390/cancers13205059.

72. Dong Y, Wang Z, Xie GF, Li C, Zuo WW, Meng G, Xu CP, Li JJ. Pregnane X receptor is associated with unfavorable survival and induces chemotherapeutic resistance by transcriptional activating multidrug resistance-related protein 3 in colorectal cancer. *Mol Cancer*. 2017;16. 71. doi: 10.1186/s12943-017-0641-8.
73. Du J, He Y, Li P, Wu W, Chen Y, Ruan H. IL-8 regulates the doxorubicin resistance of colorectal cancer cells via modulation of multidrug resistance 1 (MDR1). *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;81. 1111-1119. doi: 10.1007/s00280-018-3584-x.
74. Durinikova E, Plava J, Tyciakova S, Skvara P, Vojs Stanova A, Kozovska Z, Kucerova L, Matuskova M. Cytotoxic response of 5-fluorouracil-resistant cells to gene- and cell-directed enzyme/prodrug treatment. *Cancer Gene Ther*. 2018;25. 285-299. doi: 10.1038/s41417-018-0030-5.
75. El Bali M, Bakkach J, Bennani Mechita M. Colorectal Cancer: From Genetic Landscape to Targeted Therapy. *J Oncol*. 2021;2021. 9918116. doi: 10.1155/2021/9918116.
76. Fang Z, Gong C, Yu S, Zhou W, Hassan W, Li H, Wang X, Hu Y, Gu K, Chen X, et al. NFYB-induced high expression of E2F1 contributes to oxaliplatin resistance in colorectal cancer via the enhancement of CHK1 signaling. *Cancer Lett*. 2018;415. 58-72. doi: 10.1016/j.canlet.2017.11.040.
77. Fatemi N, Tierling S, Es HA, Varkiani M, Mojarad EN, Aghdaei HA, Walter J, Totonchi M. DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: Clinical applications for precision medicine. *Int J Cancer*. 2022;151. 2068-2081. doi: 10.1002/ijc.34186.
78. Feng X, Zhang Z, Sun P, Song G, Wang L, Sun Z, Yuan N, Wang Q, Lun L. Interleukin-18 Is a Prognostic Marker and Plays a Tumor Suppressive Role in Colon Cancer. *Dis Markers*. 2020;2020. 6439614. doi: 10.1155/2020/6439614.
79. Fichtner M, Bozkurt E, Salvucci M, McCann C, McAllister KA, Halang L, Dussmann H, Kinsella S, Crawford N, Sessler T, et al. Molecular subtype-specific responses of colon cancer cells to the SMAC mimetic Birinapant. *Cell Death Dis*. 2020;11. 1020. doi: 10.1038/s41419-020-03232-z.
80. Filip S, Vymetalkova V, Petera J, Vodickova L, Kubecek O, John S, Cecka F, Krupova M, Manethova M, Cervena K, et al. Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi: 10.3390/ijms21155255.
81. Fodor K, Dobos N, Schally A, Steiber Z, Olah G, Sipos E, Szekvolgyi L, Halmos G. The targeted LHRH analog AEZS-108 alters expression of genes related to angiogenesis and development of metastasis in uveal melanoma. *Oncotarget*. 2020;11. 175-187. doi: 10.18632/oncotarget.27431.
82. Fortenberry Y. The role of serpins in tumor cell migration. *Biol Chem*. 2015;396. 205-213. doi: 10.1515/hsz-2014-0254.
83. Francescangeli F, Contavalli P, De Angelis ML, Careccia S, Signore M, Haas TL, Salaris F, Baiocchi M, Boe A, Giuliani A, et al. A pre-existing population of ZEB2(+) quiescent cells with stemness and mesenchymal features dictate chemoresistance in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020;39. 2. doi: 10.1186/s13046-019-1505-4.
84. Frankel LB, Lubas M, Lund AH. Emerging connections between RNA and autophagy. *Autophagy*. 2017;13. 3-23. doi: 10.1080/15548627.2016.1222992.
85. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol*. 2018;20. 233-242. doi: 10.1038/s41556-018-0037-z.
86. Geis T, Doring C, Popp R, Grossmann N, Fleming I, Hansmann ML, Dehne N, Brune B. HIF-2alpha-dependent PAI-1 induction contributes to angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Exp Cell Res*. 2015;331. 46-57. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.11.018.
87. Ghafouri-Fard S, Abak A, Tondro Anamag F, Shoorei H, Fattahi F, Javadinia SA, Basiri A, Taheri M. 5-Fluorouracil: A Narrative Review on the Role of Regulatory Mechanisms in Driving Resistance to This Chemotherapeutic Agent. *Front Oncol*. 2021;11. 658636. doi: 10.3389/fonc.2021.658636.
88. Ghanbarian M, Afgar A, Yadegarazari R, Najafi R, Teimoori-Toolabi L. Through oxaliplatin resistance induction in colorectal cancer cells, increasing ABCB1 level accompanies decreasing level of miR-302c-5p, miR-3664-5p and miR-129-5p. *Biomed Pharmacother*. 2018;108. 1070-1080. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.112.

89. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci.* 2021;22. doi: 10.3390/ijms222312827.
90. Glimelius B, Stintzing S, Marshall J, Yoshino T, de Gramont A. Metastatic colorectal cancer: Advances in the folate-fluoropyrimidine chemotherapy backbone. *Cancer Treat Rev.* 2021;98. 102218. doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102218.
91. Gmeiner WH. Chemistry of Fluorinated Pyrimidines in the Era of Personalized Medicine. *Molecules.* 2020;25. doi: 10.3390/molecules25153438.
92. Golden EB, Cho HY, Jahanian A, Hofman FM, Louie SG, Schonthal AH, Chen TC. Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. *Neurosurg Focus.* 2014;37. E12. doi: 10.3171/2014.9.FOCUS14504.
93. Goodall ML, Fitzwalter BE, Zahedi S, Wu M, Rodriguez D, Mulcahy-Levy JM, Green DR, Morgan M, Cramer SD, Thorburn A. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Dev Cell.* 2016;37. 337-349. doi: 10.1016/j.devcel.2016.04.018.
94. Goulet B, Kennette W, Ablack A, Postenka CO, Hague MN, Mymryk JS, Tuck AB, Giguere V, Chambers AF, Lewis JD. Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis. *Lab Invest.* 2011;91. 1181-1187. doi: 10.1038/labinvest.2011.66.
95. Griffith M, Mwenifumbo JC, Cheung PY, Paul JE, Pugh TJ, Tang MJ, Chittaranjan S, Morin RD, Asano JK, Ally AA, et al. Novel mRNA isoforms and mutations of uridine monophosphate synthetase and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 2013;13. 148-158. doi: 10.1038/tpj.2011.65.
96. Groysman L, Carlsen L, Huntington KE, Shen WH, Zhou L, El-Deiry WS. Chemotherapy-induced cytokines and prognostic gene signatures vary across breast and colorectal cancer. *Am J Cancer Res.* 2021;11. 6086-6106. doi: does not have.
97. Gubas A, Dikic I. A guide to the regulation of selective autophagy receptors. *FEBS J.* 2022;289. 75-89. doi: 10.1111/febs.15824.
98. Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2011;25. 460-470. doi: 10.1101/gad.2016311.
99. Guo JY, Teng X, Laddha SV, Ma S, Van Nostrand SC, Yang Y, Khor S, Chan CS, Rabinowitz JD, White E. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev.* 2016;30. 1704-1717. doi: 10.1101/gad.283416.116.
100. Guo Q, Grimmig T, Gonzalez G, Giobbie-Hurder A, Berg G, Carr N, Wilson BJ, Banerjee P, Ma J, Gold JS, et al. ATP-binding cassette member B5 (ABCB5) promotes tumor cell invasiveness in human colorectal cancer. *J Biol Chem.* 2018;293. 11166-11178. doi: 10.1074/jbc.RA118.003187.
101. Gurzu S, Jung I. Subcellular Expression of Maspin in Colorectal Cancer: Friend or Foe. *Cancers (Basel).* 2021;13. doi: 10.3390/cancers13030366.
102. Gurzu S, Jung I, Sugimura H, Stefan-van Staden RI, Yamada H, Natsume H, Iwashita Y, Szodorai R, Szederjesi J. Maspin subcellular expression in wild-type and mutant TP53 gastric cancers. *World J Gastrointest Oncol.* 2020;12. 741-755. doi: 10.4251/wjgo.v12.i7.741.
103. Ha J, Kim M, Seo D, Park JS, Lee J, Lee J, Park SH. The Deubiquitinating Enzyme USP20 Regulates the TNFalpha-Induced NF-kappaB Signaling Pathway through Stabilization of p62. *Int J Mol Sci.* 2020;21. doi: 10.3390/ijms21093116.
104. Hai Ping P, Feng Bo T, Li L, Nan Hui Y, Hong Z. IL-1beta/NF-kb signaling promotes colorectal cancer cell growth through miR-181a/PTEN axis. *Arch Biochem Biophys.* 2016;604. 20-26. doi: 10.1016/j.abb.2016.06.001.
105. Han X, Chen H, Gong H, Tang X, Huang N, Xu W, Tai H, Zhang G, Zhao T, Gong C, et al. Autolysosomal degradation of cytosolic chromatin fragments antagonizes oxidative stress-induced senescence. *J Biol Chem.* 2020;295. 4451-4463. doi: 10.1074/jbc.RA119.010734.

106. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19: 579-593. doi: 10.1038/s41580-018-0033-y.
107. Hao H, Xia G, Wang C, Zhong F, Liu L, Zhang D. miR-106a suppresses tumor cells death in colorectal cancer through targeting ATG7. *Med Mol Morphol.* 2017;50: 76-85. doi: 10.1007/s00795-016-0150-7.
108. Hassin O, Oren M. Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2023;22: 127-144. doi: 10.1038/s41573-022-00571-8.
109. He Y, Zhang L, Tan F, Wang LF, Liu DH, Wang RJ, Yin XZ. MiR-153-5p promotes sensibility of colorectal cancer cells to oxaliplatin via targeting Bcl-2-mediated autophagy pathway. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2020;84: 1645-1651. doi: 10.1080/09168451.2020.1760784.
110. He L, Zhu H, Zhou S, Wu T, Wu H, Yang H, Mao H, SekharKathera C, Janardhan A, Edick AM, *et al.* Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Exp Mol Med.* 2018;50: 1-12. doi: 10.1038/s12276-018-0128-8.
111. Hennig P, Fenini G, Di Filippo M, Karakaya T, Beer HD. The Pathways Underlying the Multiple Roles of p62 in Inflammation and Cancer. *Biomedicines.* 2021;9. doi: 10.3390/biomedicines9070707.
112. Hewitt G, Carroll B, Sarallah R, Correia-Melo C, Ogrodnik M, Nelson G, Otten EG, Manni D, Antrobus R, Morgan BA, *et al.* SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy.* 2016;12: 1917-1930. doi: 10.1080/15548627.2016.1210368.
113. Hirahata M, Osaki M, Kanda Y, Sugimoto Y, Yoshioka Y, Kosaka N, Takeshita F, Fujiwara T, Kawai A, Ito H, *et al.* PAI-1, a target gene of miR-143, regulates invasion and metastasis by upregulating MMP-13 expression of human osteosarcoma. *Cancer Med.* 2016;5: 892-902. doi: 10.1002/cam4.651.
114. Ho CJ, Gorski SM. Molecular Mechanisms Underlying Autophagy-Mediated Treatment Resistance in Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;11. doi: 10.3390/cancers11111775.
115. Horos R, Buscher M, Sachse C, Hentze MW. Vault RNA emerges as a regulator of selective autophagy. *Autophagy.* 2019;15: 1463-1464. doi: 10.1080/15548627.2019.1609861.
116. Hossain MS, Karuniawati H, Jairoun AA, Urbi Z, Ooi J, John A, Lim YC, Kibria KMK, Mohiuddin AKM, Ming LC, *et al.* Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers (Basel).* 2022;14. doi: 10.3390/cancers14071732.
117. Hsieh CC, Hsu SH, Lin CY, Liaw HJ, Li TW, Jiang KY, Chiang NJ, Chen SH, Lin BW, Chen PC, *et al.* CHK2 activation contributes to the development of oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2022;127: 1615-1628. doi: 10.1038/s41416-022-01946-9.
118. Huang CY, Chiang SF, Chen WT, Ke TW, Chen TW, You YS, Lin CY, Chao KSC, Huang CY. HMGB1 promotes ERK-mediated mitochondrial Drp1 phosphorylation for chemoresistance through RAGE in colorectal cancer. *Cell Death Dis.* 2018;9: 1004. doi: 10.1038/s41419-018-1019-6.
119. Huang S, Yang ZJ, Yu C, Sinicrope FA. Inhibition of mTOR kinase by AZD8055 can antagonize chemotherapy-induced cell death through autophagy induction and down-regulation of p62/sequestosome 1. *J Biol Chem.* 2011;286: 40002-40012. doi: 10.1074/jbc.M111.297432.
120. Huang S, Okamoto K, Yu C, Sinicrope FA. p62/sequestosome-1 up-regulation promotes ABT-263-induced caspase-8 aggregation/activation on the autophagosome. *J Biol Chem.* 2013;288: 33654-33666. doi: 10.1074/jbc.M113.518134.
121. Huasong G, Zongmei D, Jianfeng H, Xiaojun Q, Jun G, Sun G, Donglin W, Jianhong Z. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 suppresses cell migration and invasion in glioma cells. *Brain Res.* 2015;1600: 59-69. doi: 10.1016/j.brainres.2014.06.017.
122. Humeniuk R, Menon LG, Mishra PJ, Gorlick R, Sowers R, Rode W, Pizzorno G, Cheng YC, Kemeny N, Bertino JR, *et al.* Decreased levels of UMP kinase as a mechanism of fluoropyrimidine resistance. *Mol Cancer Ther.* 2009;8: 1037-1044. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0716.

123. Yan XY, Qu XZ, Xu L, Yu SH, Tian R, Zhong XR, Sun LK, Su J. Insight into the role of p62 in the cisplatin resistant mechanisms of ovarian cancer. *Cancer Cell Int.* 2020;20. 128. doi: 10.1186/s12935-020-01196-w.
124. Yang C, Song J, Hwang S, Choi J, Song G, Lim W. Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells. *Redox Biol.* 2021;47. 102144. doi: 10.1016/j.redox.2021.102144.
125. Yang C, Zhou Q, Li M, Tong X, Sun J, Qing Y, Sun L, Yang X, Hu X, Jiang J, *et al.* Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines. *Sci Rep.* 2016;6. 33078. doi: 10.1038/srep33078.
126. Yang Y, Xin X, Fu X, Xu D. Expression pattern of human SERPINE2 in a variety of human tumors. *Oncol Lett.* 2018;15. 4523-4530. doi: 10.3892/ol.2018.7819.
127. Yang M, Liu E, Tang L, Lei Y, Sun X, Hu J, Dong H, Yang SM, Gao M, Tang B. Emerging roles and regulation of MiT/TFE transcriptional factors. *Cell Commun Signal.* 2018;16. 31. doi: 10.1186/s12964-018-0242-1.
128. Yang Q, Roehrl MH, Wang JY. Proteomic profiling of antibody-inducing immunogens in tumor tissue identifies PSMA1, LAP3, ANXA3, and maspin as colon cancer markers. *Oncotarget.* 2018;9. 3996-4019. doi: 10.18632/oncotarget.23583.
129. Yang X, Wei Y, Sheng F, Xu Y, Liu J, Gao L, Yang J, Sun X, Huang J, Guo Q. Comprehensive analysis of the prognosis and immune infiltration for CXC chemokines in colorectal cancer. *Aging (Albany NY).* 2021;13. 17548-17567. doi: 10.18632/aging.203245.
130. Yao CW, Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Fernando P, Oh MC, Park JE, Shilnikova K, Na SY, Jeong SU, *et al.* Reduced Autophagy in 5-Fluorouracil Resistant Colon Cancer Cells. *Biomol Ther (Seoul).* 2017;25. 315-320. doi: 10.4062/biomolther.2016.069.
131. Ichimura Y, Komatsu M. Activation of p62/SQSTM1-Keap1-Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway in Cancer. *Front Oncol.* 2018;8. 210. doi: 10.3389/fonc.2018.00210.
132. Yi EH, Lee CS, Lee JK, Lee YJ, Shin MK, Cho CH, Kang KW, Lee JW, Han W, Noh DY, *et al.* STAT3-RANTES autocrine signaling is essential for tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2013;11. 31-42. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0217.
133. Yin S, Li X, Meng Y, Finley RL, Jr., Sakr W, Yang H, Reddy N, Sheng S. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. *J Biol Chem.* 2005;280. 34985-34996. doi: 10.1074/jbc.M503522200.
134. Yoshii SR, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci.* 2017;18. doi: 10.3390/ijms18091865.
135. You Z, Jiang WX, Qin LY, Gong Z, Wan W, Li J, Wang Y, Zhang H, Peng C, Zhou T, *et al.* Requirement for p62 acetylation in the aggregation of ubiquitylated proteins under nutrient stress. *Nat Commun.* 2019;10. 5792. doi: 10.1038/s41467-019-13718-w.
136. Jaadane I, Nagbou A, Behar-Cohen F, Torriglia A. Interaction of Leukocyte Elastase Inhibitor/L-DNase II with BCL-2 and BAX. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843. 2807-2815. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.08.007.
137. Jiang K, Zhang C, Yu B, Chen B, Liu Z, Hou C, Wang F, Shen H, Chen Z. Autophagic degradation of FOXO3a represses the expression of PUMA to block cell apoptosis in cisplatin-resistant osteosarcoma cells. *Am J Cancer Res.* 2017;7. 1407-1422. doi: does not have.
138. Jiang S, Song C, Gu X, Wang M, Miao D, Lv J, Liu Y. Ubiquitin-Specific Peptidase 22 Contributes to Colorectal Cancer Stemness and Chemoresistance via Wnt/beta-Catenin Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46. 1412-1422. doi: 10.1159/000489156.
139. Jin Z, Li Y, Pitti R, Lawrence D, Pham VC, Lill JR, Ashkenazi A. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell.* 2009;137. 721-735. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.015.
140. Johdi NA, Sukor NF. Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies. *Front Immunol.* 2020;11. 1624. doi: 10.3389/fimmu.2020.01624.
141. Jones VS, Huang RY, Chen LP, Chen ZS, Fu L, Huang RP. Cytokines in cancer drug resistance: Cues to new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1865. 255-265. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.03.005.

142. Jurkovicova D, Neophytou CM, Gasparovic AC, Goncalves AC. DNA Damage Response in Cancer Therapy and Resistance: Challenges and Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2022;23. doi: 10.3390/ijms232314672.
143. Kaiyawet N, Rungrotmongkol T, Hannongbua S. Effect of halogen substitutions on dUMP to stability of thymidylate synthase/dUMP/mTHF ternary complex using molecular dynamics simulation. *J Chem Inf Model.* 2013;53. 1315-1323. doi: 10.1021/ci400131y.
144. Kanayama M, Inoue M, Danzaki K, Hammer G, He YW, Shinohara ML. Autophagy enhances NFkappaB activity in specific tissue macrophages by sequestering A20 to boost antifungal immunity. *Nat Commun.* 2015;6. 5779. doi: 10.1038/ncomms6779.
145. Karlowitz R, van Wijk SJL. Surviving death: emerging concepts of RIPK3 and MLKL ubiquitination in the regulation of necroptosis. *FEBS J.* 2023;290. 37-54. doi: 10.1111/febs.16255.
146. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M. Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front Oncol.* 2021;11. 692142. doi: 10.3389/fonc.2021.692142.
147. Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. *FEBS J.* 2015;282. 4672-4678. doi: 10.1111/febs.13540.
148. Kawamura M, Toiyama Y, Tanaka K, Saigusa S, Okugawa Y, Hiro J, Uchida K, Mohri Y, Inoue Y, Kusunoki M. CXCL5, a promoter of cell proliferation, migration and invasion, is a novel serum prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48. 2244-2251. doi: 10.1016/j.ejca.2011.11.032.
149. Ketelut-Carneiro N, Fitzgerald KA. Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis—Oh My! The Many Ways a Cell Can Die. *J Mol Biol.* 2022;434. 167378. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167378.
150. Kim HB, Lim HJ, Lee HJ, Park JH, Park SG. Evaluation and Clinical Significance of Jagged-1-activated Notch Signaling by APEX1 in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2019;39. 6097-6105. doi: 10.21873/anticancer.13817.
151. Kimmelman AC, White E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab.* 2017;25. 1037-1043. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.004.
152. Kinsey CG, Camolotto SA, Boespflug AM, Guillen KP, Foth M, Truong A, Schuman SS, Shea JE, Seipp MT, Yap JT, *et al.* Publisher Correction: Protective autophagy elicited by RAF->MEK->ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nat Med.* 2019;25. 861. doi: 10.1038/s41591-019-0433-3.
153. Kirkin V, Rogov VV. A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Mol Cell.* 2019;76. 268-285. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.005.
154. Kline CL, El-Deiry WS. Personalizing colon cancer therapeutics: targeting old and new mechanisms of action. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6. 988-1038. doi: 10.3390/ph6080988.
155. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, Abeliovich H, Abildgaard MH, Abudu YP, Acevedo-Arozena A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)I. *Autophagy.* 2021;17. 1-382. doi: 10.1080/15548627.2020.1797280.
156. Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cadwell K, Cecconi F, Choi AMK, *et al.* Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* 2021;40. e108863. doi: 10.15252/embj.2021108863.
157. Kobayashi M, Funayama R, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Wnt-beta-catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2016;107. 1776-1784. doi: 10.1111/cas.13097.
158. Korbecki J, Grochans S, Gutowska I, Barczak K, Baranowska-Bosiacka I. CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands. *Int J Mol Sci.* 2020;21. doi: 10.3390/ijms21207619.
159. Korber MI, Staribacher A, Ratzenbock I, Steger G, Mader RM. NFkappaB-Associated Pathways in Progression of Chemoresistance to 5-Fluorouracil in an In Vitro Model of Colonic Carcinoma. *Anticancer Res.* 2016;36. 1631-1639. doi: does not have.

160. Krzystek-Korpacka M, Zawadzki M, Neubauer K, Bednarz-Misa I, Gorska S, Wisniewski J, Witkiewicz W, Gamian A. Elevated systemic interleukin-7 in patients with colorectal cancer and individuals at high risk of cancer: association with lymph node involvement and tumor location in the right colon. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66: 171-179. doi: 10.1007/s00262-016-1933-3.
161. Kubala MH, DeClerck YA. The plasminogen activator inhibitor-1 paradox in cancer: a mechanistic understanding. *Cancer Metastasis Rev.* 2019;38: 483-492. doi: 10.1007/s10555-019-09806-4.
162. Kukcinaviciute E, Jonusiene V, Sasnauskiene A, Dabkeviciene D, Eidenaitė E, Laurinavicius A. Significance of Notch and Wnt signaling for chemoresistance of colorectal cancer cells HCT116. *J Cell Biochem.* 2018;119: 5913-5920. doi: 10.1002/jcb.26783.
163. Kukcinavičiūtė E. Chemoterapijams vaistams atsparių kolorektalinio vėžio ląstelių HCT116 atsako į citotoksinį poveikį molekuliniai aspektai. *Daktaro disertacija. Vilniaus universitetas. Vilnius.*
164. Kumar AV, Mills J, Lapierre LR. Selective Autophagy Receptor p62/SQSTM1, a Pivotal Player in Stress and Aging. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10: 793328. doi: 10.3389/fcell.2022.793328.
165. Kumar B, Ahmad R, Sharma S, Gowrikumar S, Primeaux M, Rana S, Natarajan A, Oupicky D, Hopkins CR, Dhawan P, et al. PIK3C3 Inhibition Promotes Sensitivity to Colon Cancer Therapy by Inhibiting Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel).* 2021;13: doi: 10.3390/cancers13092168.
166. Kumar S, Sanchez-Alvarez M, Lolo FN, Trionfetti F, Strippoli R, Cordani M. Autophagy and the Lysosomal System in Cancer. *Cells.* 2021;10: doi: 10.3390/cells10102752.
167. Kunz C, Focke F, Saito Y, Schuermann D, Lettieri T, Selfridge J, Schar P. Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-fluorouracil. *PLoS Biol.* 2009;7: e91. doi: 10.1371/journal.pbio.1000091.
168. Kurasaka C, Ogino Y, Sato A. Molecular Mechanisms and Tumor Biological Aspects of 5-Fluorouracil Resistance in HCT116 Human Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22: doi: 10.3390/ijms22062916.
169. Lasche M, Emons G, Grundker C. Shedding New Light on Cancer Metabolism: A Metabolic Tightrope Between Life and Death. *Front Oncol.* 2020;10: 409. doi: 10.3389/fonc.2020.00409.
170. Laura P-P, Gilles D, Régis D-M, Michaël B-G. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology.* 2015;4: 184-192. doi: 10.1016/j.redox.2014.12.003.
171. Lee Y, Wehl CC. Regulation of SQSTM1/p62 via UBA domain ubiquitination and its role in disease. *Autophagy.* 2017;13: 1615-1616. doi: 10.1080/15548627.2017.1339845.
172. Lee MR, Ji SY, Mia-Jan K, Cho MY. Chemoresistance of CD133(+) colon cancer may be related with increased survivin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463: 229-234. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.031.
173. Lee SH, Cho WJ, Najy AJ, Saliganan AD, Pham T, Rakowski J, Loughery B, Ji CH, Sakr W, Kim S, et al. p62/SQSTM1-induced caspase-8 aggregates are essential for ionizing radiation-mediated apoptosis. *Cell Death Dis.* 2021;12: 997. doi: 10.1038/s41419-021-04301-7.
174. Lee SJ, Jang H, Park C. Maspin increases Ku70 acetylation and Bax-mediated cell death in cancer cells. *Int J Mol Med.* 2012;29: 225-230. doi: 10.3892/ijmm.2011.833.
175. Lei G, Liu S, Yang X, He C. TRIM29 Reverses Oxaliplatin Resistance of P53 Mutant Colon Cancer Cell. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2021;2021: 8870907. doi: 10.1155/2021/8870907.
176. Lerman I, Ma X, Seger C, Maolake A, Garcia-Hernandez ML, Rangel-Moreno J, Ackerman J, Nastiuk KL, Susiarjo M, Hammes SR. Epigenetic Suppression of SERPINB1 Promotes Inflammation-Mediated Prostate Cancer Progression. *Mol Cancer Res.* 2019;17: 845-859. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0638.
177. Li DD, Zhao CH, Ding HW, Wu Q, Ren TS, Wang J, Chen CQ, Zhao QC. A novel inhibitor of ADAM17 sensitizes colorectal cancer cells to 5-Fluorouracil by reversing Notch

and epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo. *Cell Prolif.* 2018;51. e12480. doi: 10.1111/cpr.12480.

178. Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, To KF. Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *Int J Mol Sci.* 2019;20. doi: 10.3390/ijms20235999.

179. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur J Cancer.* 2010;46. 1900-1909. doi: 10.1016/j.ejca.2010.02.021.

180. Li J, Huang L, Zhao H, Yan Y, Lu J. The Role of Interleukins in Colorectal Cancer. *Int J Biol Sci.* 2020;16. 2323-2339. doi: 10.7150/ijbs.46651.

181. Li S, Wei X, He J, Tian X, Yuan S, Sun L. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. *Biomed Pharmacother.* 2018;105. 83-94. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.119.

182. Li W, Qin X, Wang B, Xu G, Zhang J, Jiang X, Chen C, Qiu F, Zou Z. MiTF is Associated with Chemoresistance to Cisplatin in A549 Lung Cancer Cells via Modulating Lysosomal Biogenesis and Autophagy. *Cancer Manag Res.* 2020;12. 6563-6573. doi: 10.2147/CMAR.S255939.

183. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer.* 2020;19. 12. doi: 10.1186/s12943-020-1138-4.

184. Li X, Yin S, Meng Y, Sakr W, Sheng S. Endogenous inhibition of histone deacetylase 1 by tumor-suppressive maspin. *Cancer Res.* 2006;66. 9323-9329. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1578.

185. Lim J, Lachenmayer ML, Wu S, Liu W, Kundu M, Wang R, Komatsu M, Oh YJ, Zhao Y, Yue Z. Proteotoxic stress induces phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to regulate selective autophagic clearance of protein aggregates. *PLoS Genet.* 2015;11. e1004987. doi: 10.1371/journal.pgen.1004987.

186. Lim SM, Mohamad Hanif EA, Chin SF. Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. *Cell Biosci.* 2021;11. 56. doi: 10.1186/s13578-021-00570-z.

187. Lin YH, Tsui KH, Chang KS, Hou CP, Feng TH, Juang HH. Maspin is a PTEN-Upregulated and p53-Upregulated Tumor Suppressor Gene and Acts as an HDAC1 Inhibitor in Human Bladder Cancer. *Cancers (Basel).* 2019;12. doi: 10.3390/cancers12010010.

188. Liu C, Zhu Y, Lou W, Cui Y, Evans CP, Gao AC. Inhibition of constitutively active Stat3 reverses enzalutamide resistance in LNCaP derivative prostate cancer cells. *Prostate.* 2014;74. 201-209. doi: 10.1002/pros.22741.

189. Liu H, Lou J, Liu Y, Liu Z, Xie J, Sun J, Pan H, Han W. Intestinal epithelial cell autophagy deficiency suppresses inflammation-associated colon tumorigenesis. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2022;28. 35-46. doi: 10.1016/j.omtn.2022.02.012.

190. Liu YP, Zheng CC, Huang YN, He ML, Xu WW, Li B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm (2020).* 2021;2. 315-340. doi: 10.1002/mco2.55.

191. Liu T, Tang Q, Liu K, Xie W, Liu X, Wang H, Wang RF, Cui J. TRIM11 Suppresses AIM2 Inflammasome by Degrading AIM2 via p62-Dependent Selective Autophagy. *Cell Rep.* 2016;16. 1988-2002. doi: 10.1016/j.celrep.2016.07.019.

192. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2. 17023-. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.

193. Liu W, Lo YL, Hsu C, Wu YT, Liao ZX, Wu WJ, Chen YJ, Kao C, Chiu CC, Wang LF. CS-PEI/Beclin-siRNA Downregulate Multidrug Resistance Proteins and Increase Paclitaxel Therapeutic Efficacy against NSCLC. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2019;17. 477-490. doi: 10.1016/j.omtn.2019.06.017.

194. Liu W, Zhang J, Yao X, Jiang C, Ni P, Cheng L, Liu J, Ni S, Chen Q, Li Q, et al. Bevacizumab-enhanced antitumor effect of 5-fluorouracil via upregulation of thymidine phosphorylase through vascular endothelial growth factor A/vascular endothelial growth factor receptor 2-specificity protein 1 pathway. *Cancer Sci.* 2018;109. 3294-3304. doi: 10.1111/cas.13779.

195. Liu X, Wu B, Chen H, Sun H, Guo X, Sun T, Zhou D, Yang S. Intense endoplasmic reticulum stress (ERS) / IRE1alpha enhanced Oxaliplatin efficacy by decreased ABCC10 in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 2022;22. 1369. doi: 10.1186/s12885-022-10415-8.
196. Liu Z, Yu M, Fei B, Sun J, Wang D. Identification Of Natural Compound Derivative For Inhibition Of XLF And Overcoming Chemoresistance In Colorectal Cancer Cells. *Drug Des Devel Ther*. 2019;13. 3823-3834. doi: 10.2147/DDDT.S215967.
197. Liu Z, Liu J, Li L, Nie D, Tao Q, Wu J, Fan J, Lin C, Zhao S, Ju D. Inhibition of Autophagy Potentiated the Antitumor Effect of Nedaplatin in Cisplatin-Resistant Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *PLoS One*. 2015;10. e0135236. doi: 10.1371/journal.pone.0135236.
198. Liu ZY, Zheng M, Li YM, Fan XY, Wang JC, Li ZC, Yang HJ, Yu JM, Cui J, Jiang JL, et al. RIP3 promotes colitis-associated colorectal cancer by controlling tumor cell proliferation and CXCL1-induced immune suppression. *Theranostics*. 2019;9. 3659-3673. doi: 10.7150/thno.32126.
199. Longhi MT, Silva LE, Pereira M, Magalhaes M, Reina J, Vitorino FNL, Gumbiner BM, da Cunha JPC, Cella N. PI3K-AKT, JAK2-STAT3 pathways and cell-cell contact regulate maspin subcellular localization. *Cell Commun Signal*. 2021;19. 86. doi: 10.1186/s12964-021-00758-3.
200. Lukaszewicz-Zajac M, Paczek S, Mroczko P, Kulczynska-Przybik A. The Significance of CXCL1 and CXCL8 as Well as Their Specific Receptors in Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res*. 2020;12. 8435-8443. doi: 10.2147/CMAR.S267176.
201. Ma J, Weng L, Jia Y, Liu B, Wu S, Xue L, Yin X, Mao A, Wang Z, Shang M. PTBP3 promotes malignancy and hypoxia-induced chemoresistance in pancreatic cancer cells by ATG12 up-regulation. *J Cell Mol Med*. 2020;24. 2917-2930. doi: 10.1111/jcmm.14896.
202. Ma L, Xu A, Kang L, Cong R, Fan Z, Zhu X, Huo N, Liu W, Xue C, Ji Q, et al. LSD1-Demethylated LINC01134 Confers Oxaliplatin Resistance Through SP1-Induced p62 Transcription in HCC. *Hepatology*. 2021;74. 3213-3234. doi: 10.1002/hep.32079.
203. Maas C, de Maat S. Therapeutic SERPINS: Improving on Nature. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8. 648349. doi: 10.3389/fcvm.2021.648349.
204. Madden EC, Gorman AM, Logue SE, Samali A. Tumour Cell Secretome in Chemoresistance and Tumour Recurrence. *Trends Cancer*. 2020;6. 489-505. doi: 10.1016/j.trecan.2020.02.020.
205. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Front Oncol*. 2016;6. 96. doi: 10.3389/fonc.2016.00096.
206. Mahajan N, Hoover B, Rajendram M, Shi HY, Kawasaki K, Weibel DB, Zhang M. Maspin binds to cardiolipin in mitochondria and triggers apoptosis. *FASEB J*. 2019;33. 6354-6364. doi: 10.1096/fj.201802182R.
207. Majewski P, Majchrzak-Gorecka M, Grygier B, Skrzeczynska-Moncznik J, Osiecka O, Cichy J. Inhibitors of Serine Proteases in Regulating the Production and Function of Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2016;7. 261. doi: 10.3389/fimmu.2016.00261.
208. Malki A, ElRuz RA, Gupta I, Allouch A, Vranic S, Al Moustafa AE. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int J Mol Sci*. 2020;22. doi: 10.3390/ijms22010130.
209. Manoochehri M, Karbasi A, Bandehpour M, Kazemi B. Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-FU in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*. 2014;20. 301-307. doi: 10.1007/s12253-013-9695-0.
210. Mao M, Wang W. SerpinE2 promotes multiple cell proliferation and drug resistance in osteosarcoma. *Mol Med Rep*. 2016;14. 881-887. doi: 10.3892/mmr.2016.5316.
211. Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, Morrione A, Giordano A, Cenciarelli C. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell Int*. 2021;21. 703. doi: 10.1186/s12935-021-02396-8.
212. Maryam S, Krukiewicz K, Haq IU, Khan AA, Yahya G, Cavalu S. Interleukins (Cytokines) as Biomarkers in Colorectal Cancer: Progression, Detection, and Monitoring. *J Clin Med*. 2023;12. doi: 10.3390/jcm12093127.

213. Marijanovic EM, Fodor J, Riley BT, Porebski BT, Costa MGS, Kass I, Hoke DE, McGowan S, Buckle AM. Reactive centre loop dynamics and serpin specificity. *Sci Rep*. 2019;9. 3870. doi: 10.1038/s41598-019-40432-w.
214. Marin JJG, Macias RIR, Monte MJ, Herraes E, Peleteiro-Vigil A, Blas BS, Sanchon-Sanchez P, Temprano AG, Espinosa-Escudero RA, Lozano E, *et al*. Cellular Mechanisms Accounting for the Refractoriness of Colorectal Carcinoma to Pharmacological Treatment. *Cancers (Basel)*. 2020;12. doi: 10.3390/cancers12092605.
215. Marmol I, Sanchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18. doi: 10.3390/ijms18010197.
216. Martens S. A division of labor in mTORC1 signaling and autophagy. *Sci Signal*. 2018;11. doi: 10.1126/scisignal.aav3530.
217. Martin M, Sun M, Motolani A, Lu T. The Pivotal Player: Components of NF-kappaB Pathway as Promising Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22. doi: 10.3390/ijms22147429.
218. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Gines A, Ruiz de Porras V, Moutinho C, Layos L, Manzano JL, Buges C, Bystrup S, Esteller M, *et al*. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol Cancer Ther*. 2015;14. 1767-1776. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0636.
219. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Musulen E, Gines A, Manzano JL, Aranda E, Plasencia C, Neamati N, Abad A. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int J Cancer*. 2009;124. 2905-2910. doi: 10.1002/ijc.24273.
220. Martini G, Ciardiello D, Vitiello PP, Napolitano S, Cardone C, Cuomo A, Troiani T, Ciardiello F, Martinelli E. Resistance to anti-epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer: What does still need to be addressed? *Cancer Treat Rev*. 2020;86. 102023. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102023.
221. Martini G, Dienstmann R, Ros J, Baraibar I, Cuadra-Urteaga JL, Salva F, Ciardiello D, Mulet N, Argiles G, Tabernero J, *et al*. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2020;12. 1758835920936089. doi: 10.1177/1758835920936089.
222. Martino-Echarri E, Henderson BR, Brocardo MG. Targeting the DNA replication checkpoint by pharmacologic inhibition of Chk1 kinase: a strategy to sensitize APC mutant colon cancer cells to 5-fluorouracil chemotherapy. *Oncotarget*. 2014;5. 9889-9900. doi: 10.18632/oncotarget.2475.
223. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018;14. 1435-1455. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314.
224. McQuade RM, Stojanovska V, Bornstein JC, Nurgali K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr Med Chem*. 2017;24. 1537-1557. doi: 10.2174/092986732466617011152436.
225. Meng Q, Wu W, Pei T, Li L, Tang X, Sun H. Novel markers for circulating tumor stem cells in colorectal carcinoma. *Am J Transl Res*. 2016;8. 4233-4241. doi: does not have.
226. Merloni F, Ranallo N, Scortichini L, Giampieri R, Berardi R. Tailored therapy in patients treated with fluoropyrimidines: focus on the role of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Drug Resist*. 2019;2. 787-802. doi: 10.20517/cdr.2018.006.
227. Miao YH, Mao LP, Cai XJ, Mo XY, Zhu QQ, Yang FT, Wang MH. Zinc oxide nanoparticles reduce the chemoresistance of gastric cancer by inhibiting autophagy. *World J Gastroenterol*. 2021;27. 3851-3862. doi: 10.3748/wjg.v27.i25.3851.
228. Mirlekar B, Pylayeva-Gupta Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13. doi: 10.3390/cancers13020167.
229. Mkaouer H, Akermi N, Kriaa A, Abraham AL, Jablaoui A, Soussou S, Mokdad-Gargouri R, Maguin E, Rhimi M. Serine protease inhibitors and human wellbeing interplay: new insights for old friends. *PeerJ*. 2019;7. e7224. doi: 10.7717/peerj.7224.

230. Moatti A, Cohen JL. The TNF-alpha/TNFR2 Pathway: Targeting a Brake to Release the Anti-tumor Immune Response. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9. 725473. doi: 10.3389/fcell.2021.725473.
231. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics: the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 2014;20. 10316-10330. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10316.
232. Mojardin L, Botet J, Quintales L, Moreno S, Salas M. New insights into the RNA-based mechanism of action of the anticancer drug 5'-fluorouracil in eukaryotic cells. *PLoS One.* 2013;8. e78172. doi: 10.1371/journal.pone.0078172.
233. Monard D. SERPINE2/Protease Nexin-1 in vivo multiple functions: Does the puzzle make sense? *Semin Cell Dev Biol.* 2017;62. 160-169. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.012.
234. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Orlowski GM, Chan FK. Differential roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-induced necroptosis and chemotherapeutic agent-induced cell death. *Cell Death Dis.* 2015;6. e1636. doi: 10.1038/cddis.2015.16.
235. Moutabian H, Majdaeen M, Ghahramani-Asl R, Yadollahi M, Gharepapagh E, Ataei G, Falahatpour Z, Bagheri H, Farhood B. A systematic review of the therapeutic effects of resveratrol in combination with 5-fluorouracil during colorectal cancer treatment: with a special focus on the oxidant, apoptotic, and anti-inflammatory activities. *Cancer Cell Int.* 2022;22. 142. doi: 10.1186/s12935-022-02561-7.
236. Muerkoster SS, Lust J, Arlt A, Hasler R, Witt M, Sebens T, Schreiber S, Folsch UR, Schafer H. Acquired chemoresistance in pancreatic carcinoma cells: induced secretion of IL-1beta and NO lead to inactivation of caspases. *Oncogene.* 2006;25. 3973-3981. doi: 10.1038/sj.onc.1209423.
237. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, Hohensinner P, Basilio J, Petzelbauer P, Assinger A, et al. Cell Type-Specific Roles of NF-kappaB Linking Inflammation and Thrombosis. *Front Immunol.* 2019;10. 85. doi: 10.3389/fimmu.2019.00085.
238. Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21. 439-458. doi: 10.1038/s41580-020-0241-0.
239. Newton K. Multitasking Kinase RIPK1 Regulates Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12. doi: 10.1101/cshperspect.a036368.
240. Nichetti F, Falvella FS, Miceli R, Cheli S, Gaetano R, Fuca G, Infante G, Martinetti A, Antoniotti C, Falcone A, et al. Is a pharmacogenomic panel useful to estimate the risk of oxaliplatin-related neurotoxicity in colorectal cancer patients? *Pharmacogenomics J.* 2019;19. 465-472. doi: 10.1038/s41397-019-0078-0.
241. Oguri T, Kunii E, Fukuda S, Sone K, Uemura T, Takakuwa O, Kanemitsu Y, Ohkubo H, Takemura M, Maeno K, et al. Organic cation transporter 6 directly confers resistance to anticancer platinum drugs. *Biomed Rep.* 2016;5. 639-643. doi: 10.3892/br.2016.772.
242. Oh SY, Kang N, Kang JY, Kim KW, Choi JH, Yang YM, Shin DM. Sestrin2 Regulates Osteoclastogenesis via the p62-TRAF6 Interaction. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9. 646803. doi: 10.3389/fcell.2021.646803.
243. Oliver JA, Ortiz R, Jimenez-Luna C, Cabeza L, Perazzoli G, Caba O, Mesas C, Melguizo C, Prados J. MMR-proficient and MMR-deficient colorectal cancer cells: 5-Fluorouracil treatment response and correlation to CD133 and MGMT expression. *J Biosci.* 2020;45. doi: does not have.
244. Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, Campbell NH, Chavali G, Chen C, del-Toro N, et al. The MIntAct project--IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res.* 2014;42. D358-363. doi: 10.1093/nar/gkt1115.
245. Ortiz Zacarias NV, Bemelmans MP, Handel TM, de Visser KE, Heitman LH. Anticancer opportunities at every stage of chemokine function. *Trends Pharmacol Sci.* 2021;42. 912-928. doi: 10.1016/j.tips.2021.08.001.
246. Paczek S, Mroczo B. The Role of Selected Serpins in Gastrointestinal (GI) Malignancies. *J Clin Med.* 2022;11. doi: 10.3390/jcm11206225.

247. Pan B, Feng B, Chen Y, Huang G, Wang R, Chen L, Song H. MiR-200b regulates autophagy associated with chemoresistance in human lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2015;6. 32805-32820. doi: 10.18632/oncotarget.5352.
248. Pan JA, Sun Y, Jiang YP, Bott AJ, Jaber N, Dou Z, Yang B, Chen JS, Catanzaro JM, Du C, *et al*. TRIM21 Ubiquitylates SQSTM1/p62 and Suppresses Protein Sequestration to Regulate Redox Homeostasis. *Mol Cell*. 2016;62. 149-151. doi: 10.1016/j.molcel.2016.03.015.
249. Pan JX, Qu F, Wang FF, Xu J, Mu LS, Ye LY, Li JJ. Aberrant SERPINE1 DNA methylation is involved in carboplatin induced epithelial-mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296. 1145-1152. doi: 10.1007/s00404-017-4547-x.
250. Pankiv S, Lamark T, Bruun JA, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *J Biol Chem*. 2010;285. 5941-5953. doi: 10.1074/jbc.M109.039925.
251. Park MH, Hong JT. Roles of NF-kappaB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;5. doi: 10.3390/cells5020015.
252. Patel M, Horgan PG, McMillan DC, Edwards J. NF-kappaB pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Transl Res*. 2018;197. 43-56. doi: 10.1016/j.trsl.2018.02.002.
253. Pavlikova N, Bartonova I, Dincakova L, Halada P, Kovar J. Differentially expressed proteins in human breast cancer cells sensitive and resistant to paclitaxel. *Int J Oncol*. 2014;45. 822-830. doi: 10.3892/ijo.2014.2484.
254. Pavon MA, Arroyo-Solera I, Tellez-Gabriel M, Leon X, Viros D, Lopez M, Gallardo A, Cespedes MV, Casanova I, Lopez-Pousa A, *et al*. Enhanced cell migration and apoptosis resistance may underlie the association between high SERPINE1 expression and poor outcome in head and neck carcinoma patients. *Oncotarget*. 2015;6. 29016-29033. doi: 10.18632/oncotarget.5032.
255. Pemberton PA. Expression and purification of recombinant human serpin B1 yields novel molecules with altered protease inhibitory activities: Functional implications. *Protein Expr Purif*. 2020;170. 105595. doi: 10.1016/j.pep.2020.105595.
256. Peng X, Gong F, Chen Y, Jiang Y, Liu J, Yu M, Zhang S, Wang M, Xiao G, Liao H. Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1-alpha-mediated signaling. *Cell Death Dis*. 2014;5. e1367. doi: 10.1038/cddis.2014.297.
257. Perego P, Robert J. Oxaliplatin in the era of personalized medicine: from mechanistic studies to clinical efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77. 5-18. doi: 10.1007/s00280-015-2901-x.
258. Poillet-Perez L, Xie X, Zhan L, Yang Y, Sharp DW, Hu ZS, Su X, Maganti A, Jiang C, Lu W, *et al*. Author Correction: Autophagy maintains tumour growth through circulating arginine. *Nature*. 2019;565. E3. doi: 10.1038/s41586-018-0815-6.
259. Pothuraju R, Rachagani S, Krishn SR, Chaudhary S, Nimmakayala RK, Siddiqui JA, Ganguly K, Lakshmanan I, Cox JL, Mallya K, *et al*. Molecular implications of MUC5AC-CD44 axis in colorectal cancer progression and chemoresistance. *Mol Cancer*. 2020;19. 37. doi: 10.1186/s12943-020-01156-y.
260. Propper DJ, Balkwill FR. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19. 237-253. doi: 10.1038/s41571-021-00588-9.
261. Qian Y, Wu X, Yokoyama Y, Okuzaki D, Taguchi M, Hirose H, Wang J, Hata T, Inoue A, Hiraki M, *et al*. E-cadherin-Fc chimera protein matrix enhances cancer stem-like properties and induces mesenchymal features in colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2019;110. 3520-3532. doi: 10.1111/cas.14193.
262. Ramkumar K, Samanta S, Kyani A, Yang S, Tamura S, Ziemke E, Stuckey JA, Li S, Chinnaswamy K, Otake H, *et al*. Mechanistic evaluation and transcriptional signature of a glutathione S-transferase omega 1 inhibitor. *Nat Commun*. 2016;7. 13084. doi: 10.1038/ncomms13084.
263. Rascio F, Spadaccino F, Rocchetti MT, Castellano G, Stallone G, Netti GS, Ranieri E. The Pathogenic Role of PI3K/AKT Pathway in Cancer Onset and Drug Resistance: An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13. doi: 10.3390/cancers13163949.

264. Rebe C, Ghiringhelli F. Interleukin-1beta and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12. doi: 10.3390/cancers12071791.
265. Reina J, Zhou L, Fontes MRM, Pante N, Cella N. Identification of a putative nuclear localization signal in the tumor suppressor maspin sheds light on its nuclear import regulation. *FEBS Open Bio*. 2019;9. 1174-1183. doi: 10.1002/2211-5463.12626.
266. Ren F, Shu G, Liu G, Liu D, Zhou J, Yuan L, Zhou J. Knockdown of p62/sequestosome 1 attenuates autophagy and inhibits colorectal cancer cell growth. *Mol Cell Biochem*. 2014;385. 95-102. doi: 10.1007/s11010-013-1818-0.
267. Rybstein MD, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. The autophagic network and cancer. *Nat Cell Biol*. 2018;20. 243-251. doi: 10.1038/s41556-018-0042-2.
268. Sanchez-Garrido J, Sancho-Shimizu V, Shenoy AR. Regulated proteolysis of p62/SQSTM1 enables differential control of autophagy and nutrient sensing. *Sci Signal*. 2018;11. doi: 10.1126/scisignal.aat6903.
269. Sanchez-Martin P, Saito T, Komatsu M. p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer. *FEBS J*. 2019;286. 8-23. doi: 10.1111/febs.14712.
270. Sanrattana W, Maas C, de Maat S. SERPINS-From Trap to Treatment. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6. 25. doi: 10.3389/fmed.2019.00025.
271. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168. 960-976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
272. Scherr AL, Jassowicz A, Pato A, Elssner C, Ismail L, Schmitt N, Hoffmeister P, Neukirch L, Gdynia G, Goeppert B, *et al*. Knockdown of Atg7 Induces Nuclear-LC3 Dependent Apoptosis and Augments Chemotherapy in Colorectal Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi: 10.3390/ijms21031099.
273. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, *et al*. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9. 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
274. Schwabe RF, Luedde T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15. 738-752. doi: 10.1038/s41575-018-0065-y.
275. Sethy C, Kundu CN. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomed Pharmacother*. 2021;137. 111285. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111285.
276. Shalapur S, Karin M. Pas de Deux: Control of Anti-tumor Immunity by Cancer-Associated Inflammation. *Immunity*. 2019;51. 15-26. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.021.
277. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015;22. 526-539. doi: 10.1038/cdd.2014.216.
278. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13. 2498-2504. doi: 10.1101/gr.1239303.
279. Sheng YH, He Y, Hasnain SZ, Wang R, Tong H, Clarke DT, Lourie R, Oancea I, Wong KY, Lumley JW, *et al*. MUC13 protects colorectal cancer cells from death by activating the NF-kappaB pathway and is a potential therapeutic target. *Oncogene*. 2017;36. 700-713. doi: 10.1038/onc.2016.241.
280. Shi Z, Yang WM, Chen LP, Yang DH, Zhou Q, Zhu J, Chen JJ, Huang RC, Chen ZS, Huang RP. Enhanced chemosensitization in multidrug-resistant human breast cancer cells by inhibition of IL-6 and IL-8 production. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135. 737-747. doi: 10.1007/s10549-012-2196-0.
281. Shin D, Kim EH, Lee J, Roh JL. RITA plus 3-MA overcomes chemoresistance of head and neck cancer cells via dual inhibition of autophagy and antioxidant systems. *Redox Biol*. 2017;13. 219-227. doi: 10.1016/j.redox.2017.05.025.
282. Shoeib T, Sharp BL. Interactions of oxaliplatin with the cytoplasmic thiol containing ligand glutathione. *Metallomics*. 2012;4. 1308-1320. doi: 10.1039/c2mt20127e.
283. Singh SS, Vats S, Chia AY, Tan TZ, Deng S, Ong MS, Arfuso F, Yap CT, Goh BC, Sethi G, *et al*. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*. 2018;37. 1142-1158. doi: 10.1038/s41388-017-0046-6.

284. Sloot YJE, Smit JW, Joosten LAB, Netea-Maier RT. Insights into the role of IL-32 in cancer. *Semin Immunol.* 2018;38. 24-32. doi: 10.1016/j.smim.2018.03.004.
285. Soleimani A, Pashirzad M, Avan A, Ferns GA, Khazaei M, Hassanian SM. Role of the transforming growth factor-beta signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2019;120. 8899-8907. doi: 10.1002/jcb.28331.
286. Song H, Zeng J, Roychoudhury S, Biswas P, Mohapatra B, Ray S, Dowlatshahi K, Wang J, Band V, Talmon G, *et al.* Targeting Histone Chaperone FACT Complex Overcomes 5-Fluorouracil Resistance in Colon Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2020;19. 258-269. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0600.
287. Song Y, Li W, Peng X, Xie J, Li H, Tan G. Inhibition of autophagy results in a reversal of taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma by enhancing taxol-induced caspase-dependent apoptosis. *Am J Transl Res.* 2017;9. 1934-1942. doi: does not have.
288. Spagnardi M, Paredes J, Zabaleta J, Garai J, Reyes T, Martello LA, Williams JL. IL-1beta enhances cell viability and decreases 5-FU sensitivity in novel colon cancer cell lines derived from African American patients. *Front Oncol.* 2022;12. 1010380. doi: 10.3389/fonc.2022.1010380.
289. Sreekumar R, Al-Saihati H, Emaduddin M, Moutasim K, Mellone M, Patel A, Kilic S, Cetin M, Erdemir S, Navio MS, *et al.* The ZEB2-dependent EMT transcriptional programme drives therapy resistance by activating nucleotide excision repair genes ERCC1 and ERCC4 in colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2021;15. 2065-2083. doi: 10.1002/1878-0261.12965.
290. Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, Florena A, Di Gaudio F, Di Gesu G, De Maria R. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res.* 2003;63. 6784-6790. doi: does not have.
291. Suarez A, Medina MV, Coso O. Autophagy in Viral Development and Progression of Cancer. *Front Oncol.* 2021;11. 603224. doi: 10.3389/fonc.2021.603224.
292. Sui G, Qiu Y, Yu H, Kong Q, Zhen B. Interleukin-17 promotes the development of cisplatin resistance in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2019;17. 944-950. doi: 10.3892/ol.2018.9645.
293. Sultana MA, Cluning C, Kwong WS, Polain N, Pavlos NJ, Ratajczak T, Walsh JP, Xu J, Rea SL. The SQSTM1/p62 UBA domain regulates Ajuba localisation, degradation and NF-kappaB signalling function. *PLoS One.* 2021;16. e0259556. doi: 10.1371/journal.pone.0259556.
294. Sun Y, Zhai L, Ma S, Zhang C, Zhao L, Li N, Xu Y, Zhang T, Guo Z, Zhang H, *et al.* Down-regulation of RIP3 potentiates cisplatin chemoresistance by triggering HSP90-ERK pathway mediated DNA repair in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2018;418. 97-108. doi: 10.1016/j.canlet.2018.01.022.
295. Sun L, Ke J, He Z, Chen Z, Huang Q, Ai W, Wang G, Wei Y, Zou X, Zhang S, *et al.* HES1 Promotes Colorectal Cancer Cell Resistance To 5-Fu by Inducing Of EMT and ABC Transporter Proteins. *J Cancer.* 2017;8. 2802-2808. doi: 10.7150/jca.19142.
296. Sun W, Li J, Zhou L, Han J, Liu R, Zhang H, Ning T, Gao Z, Liu B, Chen X, *et al.* The c-Myc/miR-27b-3p/ATG10 regulatory axis regulates chemoresistance in colorectal cancer. *Theranostics.* 2020;10. 1981-1996. doi: 10.7150/thno.37621.
297. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71. 209-249. doi: 10.3322/caac.21660.
298. Suzuki K, Bose P, Leong-Quong RY, Fujita DJ, Riabowol K. REAP: A two minute cell fractionation method. *BMC Res Notes.* 2010;3. 294. doi: 10.1186/1756-0500-3-294.
299. Suzuki T, Yamamoto M. Stress-sensing mechanisms and the physiological roles of the Keap1-Nrf2 system during cellular stress. *J Biol Chem.* 2017;292. 16817-16824. doi: 10.1074/jbc.R117.800169.
300. Takahama M, Akira S, Saitoh T. Autophagy limits activation of the inflammasomes. *Immunol Rev.* 2018;281. 62-73. doi: 10.1111/imr.12613.
301. Takahara T, Amemiya Y, Sugiyama R, Maki M, Shibata H. Amino acid-dependent control of mTORC1 signaling: a variety of regulatory modes. *J Biomed Sci.* 2020;27. 87. doi: 10.1186/s12929-020-00679-2.

302. Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, Hirose H, Wu X, Qian Y, Ikehata K, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, *et al.* Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer. *Sci Rep.* 2018;8. 17639. doi: 10.1038/s41598-018-36251-0.
303. Tamazato Longhi M, Magalhaes M, Reina J, Morais Freitas V, Cella N. EGFR Signaling Regulates Maspin/SerpinB5 Phosphorylation and Nuclear Localization in Mammary Epithelial Cells. *PLoS One.* 2016;11. e0159856. doi: 10.1371/journal.pone.0159856.
304. Tanabe S, Quader S, Cabral H, Ono R. Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies. *Front Pharmacol.* 2020;11. 904. doi: 10.3389/fphar.2020.00904.
305. Tang J, Li Y, Xia S, Li J, Yang Q, Ding K, Zhang H. Sequestosome 1/p62: A multitasker in the regulation of malignant tumor aggression (Review). *Int J Oncol.* 2021;59. doi: 10.3892/ijo.2021.5257.
306. Tang S, Lian X, Jiang J, Cheng H, Guo J, Huang C, Meng H, Li X. Tumor Suppressive Maspin-Sensitized Prostate Cancer to Drug Treatment Through Negative Regulating Androgen Receptor Expression. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8. 573820. doi: 10.3389/fcell.2020.573820.
307. Tang T, Zhu Q, Li X, Zhu G, Deng S, Wang Y, Ni L, Chen X, Zhang Y, Xia T, *et al.* Protease Nexin I is a feedback regulator of EGF/PKC/MAPK/EGR1 signaling in breast cancer cells metastasis and stemness. *Cell Death Dis.* 2019;10. 649. doi: 10.1038/s41419-019-1882-9.
308. Taniguchi K, Karin M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18. 309-324. doi: 10.1038/nri.2017.142.
309. Tao M, Liu T, You Q, Jiang Z. p62 as a therapeutic target for tumor. *Eur J Med Chem.* 2020;193. 112231. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112231.
310. Therizols G, Bash-Imam Z, Panthu B, Machon C, Vincent A, Ripoll J, Nait-Slimane S, Chalabi-Dchar M, Gaucherot A, Garcia M, *et al.* Alteration of ribosome function upon 5-fluorouracil treatment favors cancer cell drug-tolerance. *Nat Commun.* 2022;13. 173. doi: 10.1038/s41467-021-27847-8.
311. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, Puccini A, Berger MD, Soni S, McSkane M, Baba H, Lenz HJ. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2018;63. 40-47. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.11.007.
312. Torriglia A, Martin E, Jaadane I. The hidden side of SERPINB1/Leukocyte Elastase Inhibitor. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;62. 178-186. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.07.010.
313. Towers CG, Wodetzki D, Thorburn A. Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *J Cell Biol.* 2020;219. doi: 10.1083/jcb.201909033.
314. Tummers B, Green DR. Mechanisms of TNF-independent RIPK3-mediated cell death. *Biochem J.* 2022;479. 2049-2062. doi: 10.1042/BCJ20210724.
315. Turano M, Cammarota F, Duraturo F, Izzo P, De Rosa M. A Potential Role of IL-6/IL-6R in the Development and Management of Colon Cancer. *Membranes (Basel).* 2021;11. doi: 10.3390/membranes11050312.
316. Ueno T, Komatsu M. Monitoring Autophagy Flux and Activity: Principles and Applications. *Bioessays.* 2020;42. e2000122. doi: 10.1002/bies.202000122.
317. Untereiner AA, Pavlidou A, Druzhyna N, Papapetropoulos A, Hellmich MR, Szabo C. Drug resistance induces the upregulation of H(2)S-producing enzymes in HCT116 colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2018;149. 174-185. doi: 10.1016/j.bcp.2017.10.007.
318. Usui T, Sakurai M, Umata K, Elbadawy M, Ohama T, Yamawaki H, Hazama S, Takenouchi H, Nakajima M, Tsunedomi R, *et al.* Hedgehog Signals Mediate Anti-Cancer Drug Resistance in Three-Dimensional Primary Colorectal Cancer Organoid Culture. *Int J Mol Sci.* 2018;19. doi: 10.3390/ijms19041098.
319. Vaiopoulos AG, Athanasoula K, Papavassiliou AG. NF-kappaB in colorectal cancer. *J Mol Med (Berl).* 2013;91. 1029-1037. doi: 10.1007/s00109-013-1045-x.
320. Very N, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018;9. 1380-1402. doi: 10.18632/oncotarget.22377.
321. Vodenkova S, Buchler T, Cervena K, Veskrnova V, Vodicka P, Vymetalkova V. 5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future. *Pharmacol Ther.* 2020;206. 107447. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107447.

322. Vomund S, Schafer A, Parnham MJ, Brune B, von Knethen A. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int J Mol Sci.* 2017;18. doi: 10.3390/ijms18122772.
323. Waldmann TA. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10. doi: 10.1101/cshperspect.a028472.
324. Wang C, Liu Z, Xu Z, Wu X, Zhang D, Zhang Z, Wei J. The role of chemokine receptor 9/chemokine ligand 25 signaling: From immune cells to cancer cells. *Oncol Lett.* 2018;16. 2071-2077. doi: 10.3892/ol.2018.8896.
325. Wang H, Wang X, Zhang H, Deng T, Liu R, Liu Y, Li H, Bai M, Ning T, Wang J, *et al.* The HSF1/miR-135b-5p axis induces protective autophagy to promote oxaliplatin resistance through the MUL1/ULK1 pathway in colorectal cancer. *Oncogene.* 2021;40. 4695-4708. doi: 10.1038/s41388-021-01898-z.
326. Wang Y, Zhu Q, Hu H, Zhu H, Yang B, He Q, Yu L, Zeng S. Upregulation of histone acetylation reverses organic anion transporter 2 repression and enhances 5-fluorouracil sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Biochem Pharmacol.* 2021;188. 114546. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114546.
327. Wang Y, Zhu WG, Zhao Y. Autophagy substrate SQSTM1/p62 regulates chromatin ubiquitination during the DNA damage response. *Autophagy.* 2017;13. 212-213. doi: 10.1080/15548627.2016.1245262.
328. Wang J, Garbutt C, Ma H, Gao P, Hornicek FJ, Kan Q, Shi H, Duan Z. Expression and role of autophagy-associated p62 (SQSTM1) in multidrug resistant ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2018;150. 143-150. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.04.557.
329. Wang M, Han D, Yuan Z, Hu H, Zhao Z, Yang R, Jin Y, Zou C, Chen Y, Wang G, *et al.* Long non-coding RNA H19 confers 5-Fu resistance in colorectal cancer by promoting SIRT1-mediated autophagy. *Cell Death Dis.* 2018;9. 1149. doi: 10.1038/s41419-018-1187-4.
330. Wang RX, Xu XE, Huang L, Chen S, Shao ZM. eEF2 kinase mediated autophagy as a potential therapeutic target for paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer. *Ann Transl Med.* 2019;7. 783. doi: 10.21037/atm.2019.11.39.
331. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist.* 2019;2. 141-160. doi: 10.20517/cdr.2019.10.
332. Wei X, Zhang Y, Yang Z, Sha Y, Pan Y, Chen Y, Cai L. Analysis of the role of the interleukins in colon cancer. *Biol Res.* 2020;53. 20. doi: 10.1186/s40659-020-00287-2.
333. Wen J, Yeo S, Wang C, Chen S, Sun S, Haas MA, Tu W, Jin F, Guan JL. Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;149. 619-629. doi: 10.1007/s10549-015-3283-9.
334. Wilkinson DJ. Serpins in cartilage and osteoarthritis: what do we know? *Biochem Soc Trans.* 2021;49. 1013-1026. doi: 10.1042/BST20201231.
335. Wongnoppavich A, Dukaew N, Choonate S, Chairatvit K. Upregulation of maspin expression in human cervical carcinoma cells by transforming growth factor beta1 through the convergence of Smad and non-Smad signaling pathways. *Oncol Lett.* 2017;13. 3646-3652. doi: 10.3892/ol.2017.5939.
336. Wu DW, Huang CC, Chang SW, Chen TH, Lee H. Bcl-2 stabilization by paxillin confers 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *Cell Death Differ.* 2015;22. 779-789. doi: 10.1038/cdd.2014.170.
337. Wu W, Li W, Zhou Y, Zhang C. Inhibition of beclin1 affects the chemotherapeutic sensitivity of osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7. 7114-7122. doi: does not have.
338. Wurzer B, Zaffagnini G, Fracchiolla D, Turco E, Abert C, Romanov J, Martens S. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *Elife.* 2015;4. e08941. doi: 10.7554/eLife.08941.
339. Xian Z, Hu B, Wang T, Zeng J, Cai J, Zou Q, Zhu P. lncRNA UCA1 Contributes to 5-Fluorouracil Resistance of Colorectal Cancer Cells Through miR-23b-3p/ZNF281 Axis. *Onco Targets Ther.* 2020;13. 7571-7583. doi: 10.2147/OTT.S258727.
340. Xie T, Geng J, Wang Y, Wang L, Huang M, Chen J, Zhang K, Xue L, Liu X, Mao X, *et al.* FOXM1 evokes 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer depending on ABC10. *Oncotarget.* 2017;8. 8574-8589. doi: 10.18632/oncotarget.14351.

341. Xu B, Deng C, Wu X, Ji T, Zhao L, Han Y, Yang W, Qi Y, Wang Z, Yang Z, *et al.* CCR9 and CCL25: A review of their roles in tumor promotion. *J Cell Physiol.* 2020;235: 9121-9132. doi: 10.1002/jcp.29782.
342. Xu C, Wu J, Wu Y, Ren Z, Yao Y, Chen G, Fang EF, Noh JH, Liu YU, Wei L, *et al.* TNF-alpha-dependent neuronal necroptosis regulated in Alzheimer's disease by coordination of RIPK1-p62 complex with autophagic UVRAG. *Theranostics.* 2021;11: 9452-9469. doi: 10.7150/thno.62376.
343. Xu J, Su Y, Xu A, Fan F, Mu S, Chen L, Chu Z, Zhang B, Huang H, Zhang J, *et al.* miR-221/222-Mediated Inhibition of Autophagy Promotes Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. *Mol Ther.* 2019;27: 559-570. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.01.012.
344. Xu JL, Yuan L, Tang YC, Xu ZY, Xu HD, Cheng XD, Qin JJ. The Role of Autophagy in Gastric Cancer Chemoresistance: Friend or Foe? *Front Cell Dev Biol.* 2020;8: 621428. doi: 10.3389/fcell.2020.621428.
345. Xu N, Zhang J, Shen C, Luo Y, Xia L, Xue F, Xia Q. Cisplatin-induced downregulation of miR-199a-5p increases drug resistance by activating autophagy in HCC cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423: 826-831. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.06.048.
346. Xu W, Wei Q, Han M, Zhou B, Wang H, Zhang J, Wang Q, Sun J, Feng L, Wang S, *et al.* CCL2-SQSTM1 positive feedback loop suppresses autophagy to promote chemoresistance in gastric cancer. *Int J Biol Sci.* 2018;14: 1054-1066. doi: 10.7150/ijbs.25349.
347. Zamame Ramirez JA, Romagnoli GG, Kaneno R. Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy. *Life Sci.* 2021;265: 118745. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118745.
348. Zeng F, Chen X, Cui W, Wen W, Lu F, Sun X, Ma D, Yuan Y, Li Z, Hou N, *et al.* RIPK1 Binds MCU to Mediate Induction of Mitochondrial Ca(2+) Uptake and Promotes Colorectal Oncogenesis. *Cancer Res.* 2018;78: 2876-2885. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3082.
349. Zeng J, Tang ZH, Liu S, Guo SS. Clinicopathological significance of overexpression of interleukin-6 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2017;23: 1780-1786. doi: 10.3748/wjg.v23.i10.1780.
350. Zhai JM, An YH, Wang W, Fan YG, Yao GL. IL-32 expression indicates unfavorable prognosis in patients with colon cancer. *Oncol Lett.* 2019;17: 4655-4660. doi: 10.3892/ol.2019.10136.
351. Zhang Y, Xu Z, Sun Y, Chi P, Lu X. Knockdown of KLK11 reverses oxaliplatin resistance by inhibiting proliferation and activating apoptosis via suppressing the PI3K/AKT signal pathway in colorectal cancer cell. *Onco Targets Ther.* 2018;11: 809-821. doi: 10.2147/OTT.S151867.
352. Zhang YZ, An JH, Liu YX, Wu XC, Han SS, Ren XQ, Qin CJ. XRCC2-Deficient Cells are Highly Sensitive to 5-Fluorouracil in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43: 1207-1219. doi: 10.1159/000481762.
353. Zhang J, Yang S, Xu B, Wang T, Zheng Y, Liu F, Ren F, Jiang J, Shi H, Zou B, *et al.* p62 functions as an oncogene in colorectal cancer through inhibiting apoptosis and promoting cell proliferation by interacting with the vitamin D receptor. *Cell Prolif.* 2019;52: e12585. doi: 10.1111/cpr.12585.
354. Zhang J, Tao J, Gao RN, Wei ZY, He YS, Ren CY, Li QC, Liu YS, Wang KW, Yang G, *et al.* Cytotoxic T-Cell Trafficking Chemokine Profiles Correlate With Defined Mucosal Microbial Communities in Colorectal Cancer. *Front Immunol.* 2021;12: 715559. doi: 10.3389/fimmu.2021.715559.
355. Zhang J, Wu Q, Zhu L, Xie S, Tu L, Yang Y, Wu K, Zhao Y, Wang Y, Xu Y, *et al.* SERPINE2/PN-1 regulates the DNA damage response and radioresistance by activating ATM in lung cancer. *Cancer Lett.* 2022;524: 268-283. doi: 10.1016/j.canlet.2021.10.001.
356. Zhang L, Li B, Zhang B, Zhang H, Suo J. miR-361 enhances sensitivity to 5-fluorouracil by targeting the FOXM1-ABCC5/10 signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2019;18: 4064-4073. doi: 10.3892/ol.2019.10741.
357. Zhang R, Pan T, Xiang Y, Zhang M, Feng J, Liu S, Duan T, Chen P, Zhai B, Chen X, *et al.* beta-Element Reverses the Resistance of p53-Deficient Colorectal Cancer Cells to 5-

Fluorouracil by Inducing Pro-death Autophagy and Cyclin D3-Dependent Cycle Arrest. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8. 378. doi: 10.3389/fbioe.2020.00378.

358. Zhang W, Xu J, Fang H, Tang L, Chen W, Sun Q, Zhang Q, Yang F, Sun Z, Cao L, *et al.* Endothelial cells promote triple-negative breast cancer cell metastasis via PAI-1 and CCL5 signaling. *FASEB J.* 2018;32. 276-288. doi: 10.1096/fj.201700237RR.

359. Zhang Z, Xu L, Huang L, Li T, Wang JY, Ma C, Bian X, Ren X, Li H, Wang X. Glutathione S-Transferase Alpha 4 Promotes Proliferation and Chemoresistance in Colorectal Cancer Cells. *Front Oncol.* 2022;12. 887127. doi: 10.3389/fonc.2022.887127.

360. Zhao Z, Zhang G, Li W. Elevated Expression of ERCC6 Confers Resistance to 5-Fluorouracil and Is Associated with Poor Patient Survival in Colorectal Cancer. *DNA Cell Biol.* 2017;36. 781-786. doi: 10.1089/dna.2017.3768.

361. Zhong Z, Yu J, Virshup DM, Madan B. Wnts and the hallmarks of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2020;39. 625-645. doi: 10.1007/s10555-020-09887-6.

362. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell.* 2016;166. 288-298. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.051.

363. Zhou HM, Zhang JG, Zhang X, Li Q. Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6. 62. doi: 10.1038/s41392-020-00430-1.

364. Zhou X, Shan Z, Yang H, Xu J, Li W, Guo F. RelB plays an oncogenic role and conveys chemo-resistance to DLD-1 colon cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2018;18. 181. doi: 10.1186/s12935-018-0677-x.

365. Zhu DJ, Chen XW, Zhang WJ, Wang JZ, Ouyang MZ, Zhong Q, Liu CC. Twist1 is a potential prognostic marker for colorectal cancer and associated with chemoresistance. *Am J Cancer Res.* 2015;5. 2000-2011. doi: does not have.

366. Zhu L, Liu L. New Insights Into the Interplay Among Autophagy, the NLRP3 Inflammasome and Inflammation in Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13. 739882. doi: 10.3389/fendo.2022.739882.

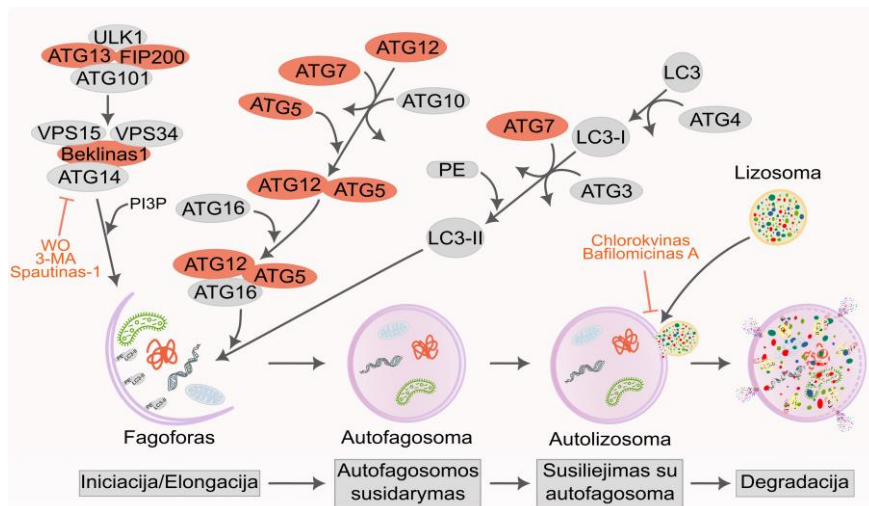
367. Zitkute V, Jasinevicius A, Vaitiekaite G, Kukcinaviciute E, Aleksandraviciute B, Eidenaitė E, Sudeikis L, Jonusiene V, Sasnauskiene A. The role of p62 in cell death and survival of 5-fluorouracil and oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells. *J Cell Biochem.* 2023;124. 1779-1791. doi: 10.1002/jcb.30488.

368. Zoetemelk M, Ramzy GM, Rausch M, Nowak-Sliwinska P. Drug-Drug Interactions of Irinotecan, 5-Fluorouracil, Folinic Acid and Oxaliplatin and Its Activity in Colorectal Carcinoma Treatment. *Molecules.* 2020;25. doi: 10.3390/molecules25112614.

369. Zotti T, Scudiero I, Settembre P, Ferravante A, Mazzone P, D'Andrea L, Reale C, Vito P, Stilo R. TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Mol Immunol.* 2014;58. 27-31. doi: 10.1016/j.molimm.2013.10.015.

PRIEDAI

1 priedas. Autofagijos slopinimo būdai, padidinantys chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių jautrumą vaistams.



1 pr. 1 pav. Autofagijos slopinimas, mažinantis vaistams atsparių vėžinių ląstelių gyvybingumą. Raudonai pažymėti 1.3 lentelėje paminėti autofagijos inhibitoriai ir baltymai. WO – vortmaninas, 3-MA – 3-metiladeninas, PE – fosfatidiletanolaminas; PI3P – fosfatidilinozitolio 3-fosfatas. Parengta pagal S. M. Lim et al., 2021 ir H. Wang et al., 2021.

2 priedas. kPGR naudotų pradmenų sąrašas su sekomis.

2 pr. 1 lentelė. kPGR naudotų pradmenų sąrašas ir sekos.

Genas	Tiesioginis (5' → 3')	Atvirkštinis (5' → 3')
<i>HPRT</i>	tggcgtcgtgattagtgatg	acccttccaaatcctcagc
<i>TBP</i>	tgtaccgcagctgcaaaat	ggattatattcggcgtttcg
<i>ATG3</i>	gccgttaaagagatcacactgg	gggtagcctcatctgtttccaa
<i>ATG5</i>	gagtaggtttggctttggtga	cacacatctcgaagcacatct
<i>ATG7</i>	ctgtggttgccggaagtg	ccagcagagtcaccattgtagt
<i>ATG12</i>	tagagcgaacacgaaccatc	catcactgccaaaacactcatag
<i>SQSTM1</i>	tgaaacacggacacttcgg	atcaacttcaatgccagagg
<i>SE1</i>	cctcaggaagcccctagaga	tggagaggctcttggctgaa
<i>SE2</i>	acggcgtaaatggagtgtg	ggagacgatggccttgttga
<i>SB1</i>	cggcctgtcggttttcac	tctcactcaagccaggaac
<i>SB5</i>	gctccacatccaggtcttt	catccattgctgggcttgg
<i>IL1A</i>	agcatggtgtagtagcaacc	tctcaggcatctccttcagc
<i>IL1B</i>	tgaagtgtccttccaggac	gaaccagcatcttctcagc
<i>IL6</i>	agccctgagaaaggagacat	tttcagccatcttggagg
<i>IL7</i>	cgatcaattattggacagcatgaa	cgagcagcacggaataaaa
<i>IL8</i>	gaaggtgcagttttccaag	ggtccacttcaatcactctcag
<i>IL10</i>	tgcccttaataagctccaagaga	tgtcaaaactactcatggcttt
<i>IL12A</i>	gaccttttcataactaatgggagt	ctaaggcagaggccatcat
<i>IL12B</i>	cagggacatcatcaaacctg	agggctactcccagctgacct
<i>IL13</i>	accagaaggtccgctct	tgcacagtacatgccagct
<i>IL18</i>	ctttaaggaaatgaatcctcctg	aaggtctctctttttcacaagc
<i>IL32</i>	agagctggaggacactca	tcataataagcccactgtc
<i>CCL25</i>	gcaatcaatgccccagtcac	cttgaagatcacagttcttggg
<i>CXCL1</i>	tgctgaacagtgacaaatcca	ttctcctaagcgatgctcaa
<i>CXCL3</i>	aagatactgaacaaggggagcac	tttcagctctgtaaggga
<i>CXCL4</i>	caactgatagccacgctgaa	agcaaatgcacacagctagg
<i>CXCL5</i>	tgtttacagaccacgcaagg	ggaggctaccacttccacct
<i>CXCL10</i>	tacgtgtacctgcatcagc	ttgtagcaatgatctcaacagc
<i>CXCL11</i>	tgacaaaatagaagtattattacc	tgctctttccaggactca
<i>TNF</i>	ccaggcagtcagatcatctc	cagcttgagggttctgctaca
<i>EGF</i>	tgcattgcaactgtgttttg	cagttcccaccactcaggt
<i>IL1R1</i>	ttgcgtgtaagaaatcatctt	ccatataagggcacacaagtcc
<i>IL6R</i>	cacttgctggtggatgtcc	ggacccactcacaacaac
<i>CCR9</i>	cctccacagagcaggcttg	ggcctggaggagatgtgaa
<i>CXCR1</i>	ccggtgctcagtttagatca	ggcatgccagtgaaattaga
<i>CXCR2</i>	agcgaccagtcaggattta	tctcaagctgtcactctcca
<i>CXCR4</i>	gcagcaggtagcaaatgac	gaagtgtatatactgatcccccca
<i>EGFR</i>	ggaaaagaagtttccaagg	acataaccagccactcctg

3 priedas. Citokinių transkriptų raiška HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose.

3 pr. 1 lentelė. Citokinių transkriptų kiekio pokyčiai HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse

Citokinai	HCT116/FU			HCT116/OXA		
	HPRT	TBP	Pokytis	HPRT	TBP	Pokytis
<i>IL1A</i>	10,4 ± 2	8,2 ± 2,3	↑	1,2 ± 0,8	0,9 ± 0,5	-
<i>IL1B</i>	2,2 ± 1,2	1,8 ± 0,8	-	1,1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	-
<i>IL6</i>	2,8 ± 1,1	2,3 ± 0,6	↑	5,6 ± 0,9	4 ± 0,6	↑
<i>IL7</i>	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	-	0,1 ± 0	0,2 ± 0,1	↓
<i>IL10</i>	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,3	-	1,4 ± 0,4	1,9 ± 0,6	-
<i>IL12A</i>	3,7 ± 0,5	3,2 ± 0,5	↑	1,1 ± 0,7	0,8 ± 0,4	-
<i>IL12B</i>	1,6 ± 0,4	1,3 ± 0,3	-	2,6 ± 0,8	1,9 ± 0,5	-
<i>IL13</i>	1,6 ± 0,4	1,4 ± 0,2	-	1,9 ± 0,5	1,4 ± 0,3	-
<i>IL18</i>	0,6 ± 0	0,5 ± 0,1	-	1,1 ± 0,1	0,8 ± 0,1	-
<i>IL32</i>	8,3 ± 1,7	6,5 ± 1,7	↑	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,2	-
<i>CCL25</i>	2,1 ± 1,5	1,7 ± 0,9	-	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	-
<i>CXCL1</i>	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,1	-	2,2 ± 0,3	3,1 ± 0,5	↑
<i>CXCL3</i>	2,9 ± 0,7	2,5 ± 0,5	↑	2,1 ± 0,4	1,5 ± 0,2	-
<i>CXCL4</i>	2,9 ± 1,7	2,3 ± 1,1	↑	1,2 ± 0,7	0,8 ± 0,5	-
<i>CXCL5</i>	4 ± 2,7	3,2 ± 1,8	↑	1,1 ± 0,4	0,8 ± 0,2	-
<i>CXCL8</i>	14,3 ± 2,9	11,6 ± 0,2	↑	1,6 ± 0,7	1,2 ± 0,5	-
<i>CXCL10</i>	2,3 ± 1	2 ± 0,8	↑	1,3 ± 0,2	0,9 ± 0	-
<i>CXCL11</i>	2,3 ± 0,8	1,5 ± 0,3	-	4,1 ± 0,2	3,4 ± 0,4	↑
<i>EGF</i>	4,8 ± 1,4	3,6 ± 1,2	↑	1,5 ± 0,4	1,9 ± 1	-
<i>TNF</i>	5,1 ± 2,6	4,2 ± 2,2	↑	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	-
<i>IL1R1</i>	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,5	-	1,2 ± 0,1	1 ± 0,1	-
<i>IL6R</i>	1,5 ± 0,2	1,1 ± 0,4	-	1,2 ± 0,2	1 ± 0,1	-
<i>CCR9</i>	1,7 ± 0,6	1,3 ± 0,8	-	1,7 ± 0,7	1,4 ± 0,8	-
<i>CXCR1</i>	5 ± 0,5	3,7 ± 1,4	↑	14 ± 3	11,4 ± 1,4	↑
<i>CXCR2</i>	5,6 ± 2,5	3,8 ± 1,3	↑	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,3	↓
<i>CXCR4</i>	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	↓	2,9 ± 1	2,3 ± 0,6	↑
<i>EGFR</i>	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	-	1,8 ± 0,5	2,2 ± 1	-

Pateikta: vidurkis ± SD, n = 3. ↑ – transkripto kiekis padidėjo; ↓ – sumažėjo; – – nepasikeitė, lyginant su HCT116 ląstelėmis.

3 pr. 2 lentelė. Citokinių transkriptų kiekio pokyčiai po 5-FU ir OxaPt poveikio

	Citokinai	5-FU konc. mM			OxaPt konc. mM		
		0,1	0,3	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
HCT116	<i>IL1A</i>	6,4 ± 0	11 ± 0,1	↑	3,4 ± 0	8,6 ± 0,1	↑
	<i>IL6</i>	1,3 ± 0,2	2,3 ± 0,3	↑ _{0,3}	3 ± 0,4	9,1 ± 0,9	↑
	<i>IL32</i>	2,2 ± 0,2	3,8 ± 0,1	↑	2,2 ± 0,1	4 ± 0,2	↑
	<i>CXCL8</i>	5,4 ± 0,4	17,4 ± 0,6	↑	2,7 ± 0	9,8 ± 0,8	↑
	<i>EGF</i>	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,1	↑ _{0,3}	0,5 ± 0	0,4 ± 0	↓
	<i>CXCR1</i>	13,2 ± 0,8	19,5 ± 1	↑	11 ± 0,9	17,1 ± 2,8	↑
	<i>CXCR2</i>	23,6 ± 0,7	29,4 ± 1,9	↑	15,1 ± 0,6	7,4 ± 0,3	↑
	<i>EGFR</i>	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1	↑ _{0,1}	3,1 ± 0,1	1 ± 0	↓ _{0,03}
HCT116/FU	<i>IL1A</i>	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,3	-	2,3 ± 0,1	3,4 ± 0,3	↑
	<i>IL6</i>	2,9 ± 0,8	4,5 ± 0,8	↑	7,5 ± 1,4	16,7 ± 4,4	↑
	<i>IL32</i>	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	-	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,2	-
	<i>CXCL8</i>	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	-	2,8 ± 0,1	6,6 ± 0,3	↑
	<i>EGF</i>	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	-	0,9 ± 0	0,6 ± 0	-
	<i>CXCR1</i>	2,4 ± 0,3	2,4 ± 0,4	↑	7,4 ± 1,7	11,4 ± 1,6	↑
	<i>CXCR2</i>	2,8 ± 0,3	2,5 ± 0,2	↑	4,6 ± 1,4	1,6 ± 0	↑ _{0,03}
	<i>EGFR</i>	0,8 ± 0	0,9 ± 0	-	2 ± 0	1,2 ± 0	↑ _{0,03}
HCT116/OXA	<i>IL1A</i>	3,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2	↑	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0	-
	<i>IL6</i>	1,3 ± 0	2 ± 0,2	↑ _{0,3}	0,7 ± 0,2	1,1 ± 0,3	-
	<i>IL32</i>	1 ± 0,1	1,4 ± 0,2	-	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	-
	<i>CXCL8</i>	5,5 ± 0,3	9,1 ± 0,3	↑	1,1 ± 0	1,8 ± 0	-
	<i>EGF</i>	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,4	↑ _{0,3}	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0	-
	<i>CXCR1</i>	10,9 ± 0,8	18,9 ± 0,5	↑	2,2 ± 0,4	3,7 ± 0,3	↑
	<i>CXCR2</i>	1,4 ± 0,1	2,4 ± 0,2	↑ _{0,3}	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0	↓
	<i>EGFR</i>	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	-	1 ± 0,2	0,8 ± 0,1	-

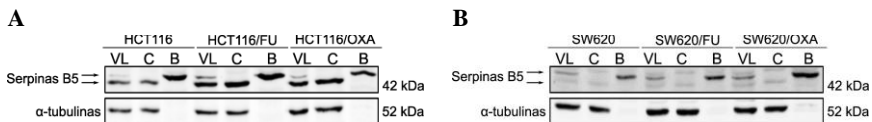
Pateikta techninių pakartojimų vidurkis ± SD; n = 3. ↑ – transkripto kiekis padidėjo; ↓ – sumažėjo; - – nepasikeitė, lyginant su vaistais neveiktomis ląstelėmis.

4 priedas. Serpinų raiška HCT116 ir SW620 ląstelėse ir jų sublinijose.

4 pr. 1 lentelė. Serpinų transkriptų raiškos pokyčiai po 5-FU ir OxaPt poveikio

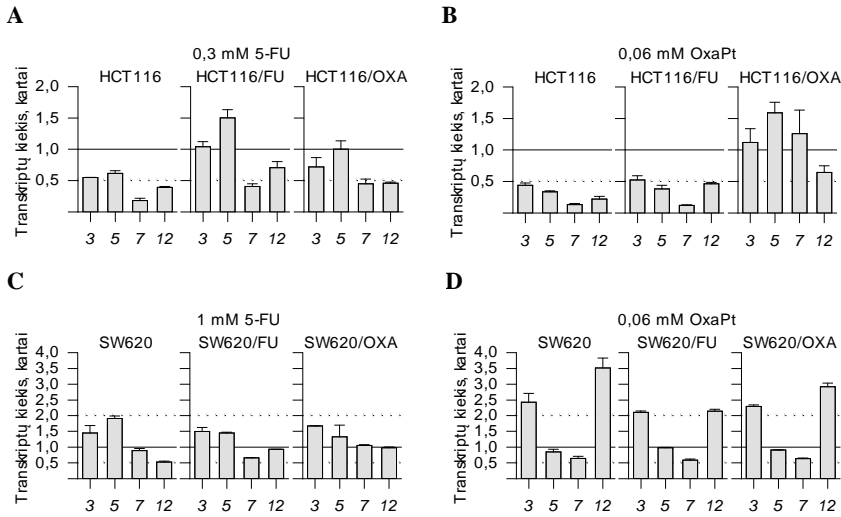
Serpinas	5-FU konc. mM			OxaPt konc. mM		
HCT116	0,1	0,3	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
<i>SBI</i>	1,5 ± 0	1,5 ± 0	-	1,2 ± 0	0,9 ± 0,2	-
<i>SB2</i>	9,9 ± 0,9	11,9 ± 1,8	↑	9,6 ± 3	9,3 ± 1,8	↑
<i>SE1</i>	9,5 ± 0,1	11,8 ± 0,5	↑	7,8 ± 0,8	7,8 ± 0,1	↑
<i>SE2</i>	1,9 ± 0,2	2,2 ± 0	↑ _{0,3}	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0	-
HCT116/FU	0,1	0,3	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
<i>SBI</i>	1,2 ± 0,3	1,4 ± 0,2	-	1,2 ± 0	1,1 ± 0,2	-
<i>SB2</i>	2,7 ± 0,8	3,7 ± 1,2	↑	6,1 ± 1,2	5,9 ± 1,5	↑
<i>SE1</i>	3 ± 1,1	3,2 ± 1	↑	5,5 ± 0,6	8,3 ± 2,6	↑
<i>SE2</i>	1 ± 0,1	1,1 ± 0,2	-	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0	-
HCT116/OXA	0,1	0,3	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
<i>SBI</i>	1,7 ± 0	2 ± 0,4	↑ _{0,3}	1 ± 0,1	1,2 ± 0,2	-
<i>SB2</i>	2,4 ± 0,2	3,2 ± 0,4	↑	1,4 ± 0,4	1,7 ± 0,4	-
<i>SE1</i>	3 ± 0,6	4 ± 0,3	↑	1,2 ± 0	1,9 ± 0,3	-
<i>SE2</i>	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,2	-	1 ± 0,1	1 ± 0,1	-
SW620	0,3	1	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
<i>SBI</i>	1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	-	1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	-
<i>SB2</i>	2,8 ± 0,2	2,3 ± 0,2	↑	2 ± 0,1	5,2 ± 0,3	↑
<i>SE1</i>	2,3 ± 0,2	2 ± 0,2	↑	2,2 ± 0,2	3,1 ± 0,3	↑
<i>SE2</i>	2,4 ± 0	2,1 ± 0	↑	1,7 ± 0	0,8 ± 0	-
SW620/FU	0,3	4	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
<i>SBI</i>	0,8 ± 0	0,8 ± 0	-	0,6 ± 0	0,4 ± 0	↓ _{0,06}
<i>SB2</i>	4,3 ± 0,5	3,1 ± 0,4	↑	3,5 ± 0,5	7,2 ± 1,1	↑
<i>SE1</i>	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,3	↑	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3	-
<i>SE2</i>	1,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	-	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,1	↓ _{0,06}
SW620/OXA	0,3	1	Pokytis	0,03	0,06	Pokytis
<i>SBI</i>	1,7 ± 0,9	2 ± 0,9	↑ ₁	1 ± 0,8	1,2 ± 0,6	-
<i>SB2</i>	3,1 ± 0,6	2,4 ± 0,5	↑	4,1 ± 0,8	4,2 ± 0,9	↑
<i>SE1</i>	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	-	1,7 ± 0	1,7 ± 0,1	-
<i>SE2</i>	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,2	↑	0,8 ± 0	0,4 ± 0	↓ _{0,06}

Pateikta: vidurkis ± SD; n = 3. ↑ – transkripto kiekis padidėjo; ↓ – sumažėjo; -- neapsakytė, lyginant su vaistais neveiktomis ląstelėmis.

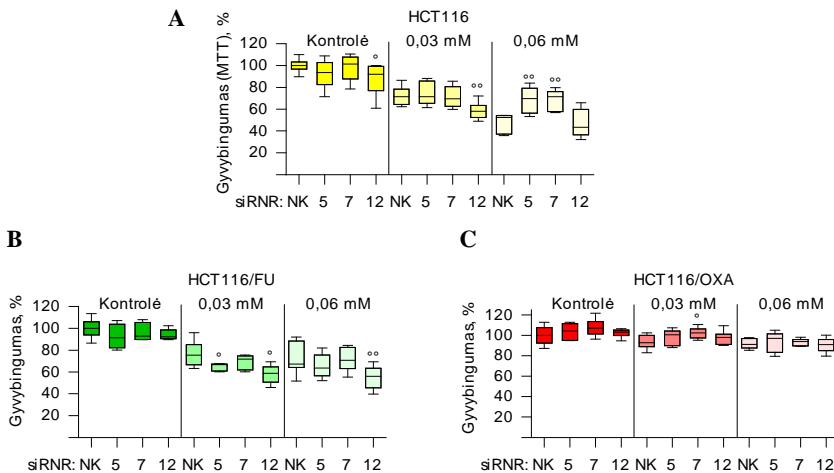


4 pr. 1 pav. SB5 pasiskirstymas HCT116 (A) ir SW620 (B) ląstelių ir jų sublinijų citoplazmoje ir branduoliuose. Ląstelių frakcijų atskyrimas REAP metodu atliktas praėjus 96 val. po ląstelių užsėjimo. VL – visas lizatas, C – citoplazmos ir B – branduolio frakcijos.

5 priedas. Autofagijos reikšmė CRC ląstelių atsparumui.

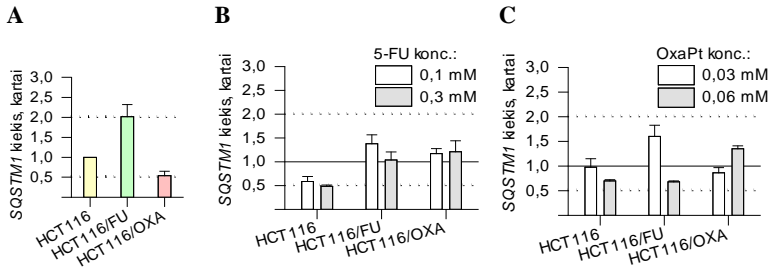


5 pr. 1 pav. *ATG3* (3), *ATG5* (5), *ATG7* (7), *ATG12* (12) transkriptų kiekis HCT116 (A-B) ir SW620 (C-D) ląstelėse bei jų sublinijose po 5-FU ar OxaPt poveikio. kPCR atlikta 24 val. po poveikio. Kiekis normalizuotas pagal *TBP* atskaitos geną. Pokyčiai skaičiuoti nuo kontrolinių ląstelių (ištinė linija). Punktyrinės linijos žymi biologiškai reikšmingą kiekio pokytį. Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$.

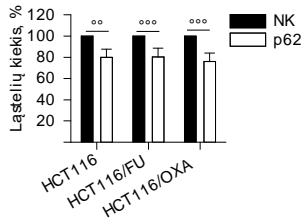


5 pr. 2 pav. Autofagijos reikšmė OxaPt atsparumui HCT116 (A), HCT116/FU (B) ir HCT116/OXA (C) ląstelėse. MTT matuotas 72 val. po transfekcijos (48 val. po OxaPt poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys, 5 – *ATG5*, 7 – *ATG7*, 12 – *ATG12* transkriptams specifinės siRNR. Pateikta: viršutinė ir apatinė paklaidų riba, atitinkamai, 90-tas ir 10-tas procentilis, dėžutė – IQR, linija – mediana; $n \geq 3$. ° nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp NK ir specifinėmis siRNR veiktų ląstelių. °/°, kai $p \leq 0,05/0,01$.

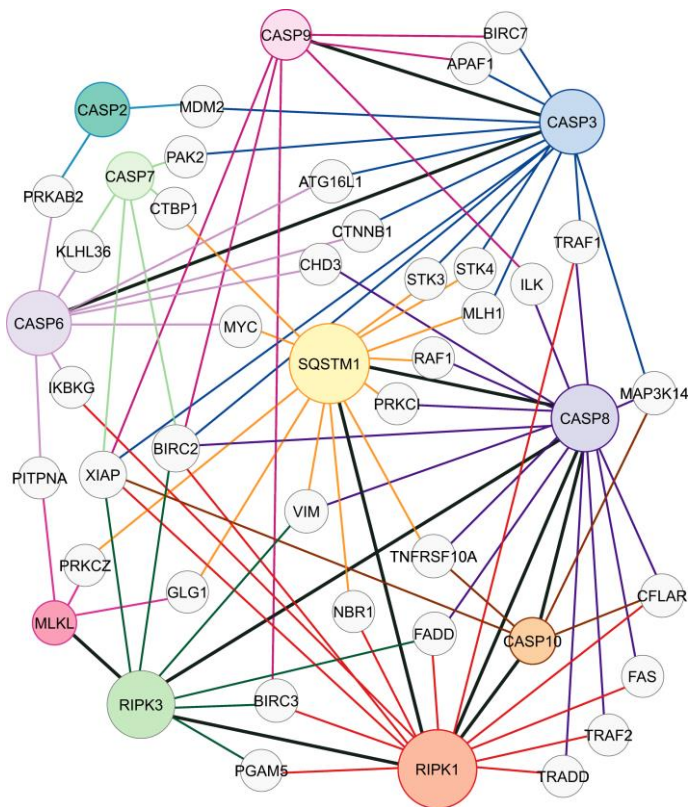
6 priedas. p62 raiška ir funkcijos HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose.



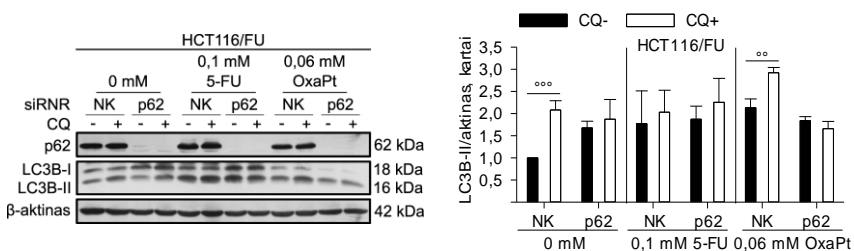
6 pr. 1 pav. *SQSTM1* transkripto kiekis HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose (A) bei po 5-FU (B) ir OxaPt (C) poveikio. kPGR atlikta praėjus 24 val. po vaistų poveikio. Kiekis normalizuotas pagal *TBP* atskaitos geną. Pokyčiai skaičiuoti nuo vaistais neveiktų ląstelių (ištininė linija). Punktyrinė linija žymi biologiškai reikšmingą kiekio pokytį Pateikta vidurkis + SD, $n \geq 3$.



6 pr. 2 pav. p62 reikšmė 5-FU ir OxaPt atsparumui HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Ląstelės skaičiuotos hemacitometru praėjus 72 val. po transfekcijos. NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkiai + SD, $n \geq 3$. ° nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp NK ir p62 siRNR veiktų ląstelių. °°/°°°, kai $p \leq 0,01/0,001$.

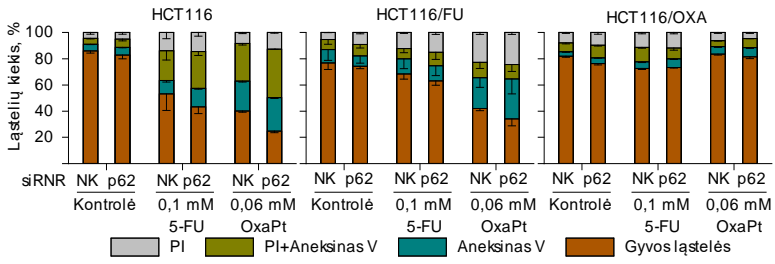


6 pr. 3 pav. p62 ir žūties baltymų tarpusavio sąveikų tinklas (PPI). Pagrindiniai mazgais parinkti p62 (SQSTM1) ir baltymai, dalyvaujantys apoptozėje bei nekroptozėje. Jų dydžiai yra tiesiogiai proporcingi sąveikų skaičiui. Linijų spalvos atitinka pagrindinių mazgų spalvas ir nurodo jų sąveikas su kitais baltymais. Juodos linijos nurodo tiesiogines sąveikas tarp pagrindinių mazgų.

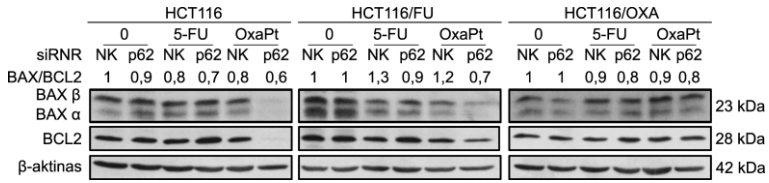


6 pr. 4 pav. Autofagijos srautas po p62 raiškos tildymo HCT116/FU ląstelėse. Baltymų kiekis vertintas praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po 0,1 mM 5-FU ar 0,06 mM OxaPt poveikio). Autofagijos srautui nustatyti ląstelės prieš surinkimą inkubuotos 4 val. su 30 μM CQ. NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkis + SD, n = 3. °, nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp mėginių, inkubuotų su (+) ir be (-) CQ. °°, kai p ≤ 0,01.

A



B



6 pr. 5 pav. p62 raiškos tildymo įtaka apoptozei HCT116 ląstelėse ir jų sublinijose. Apoptozinių ląstelių frakcijos nustatytos ląstelės dažant propidžio jodidu (PI) ir aneksinu V (A) bei BAX ir BCL2 baltymų kiekis nustatyti praėjus 72 val. po transfekcijos (48 val. po 0,1 mM 5-FU ar 0,06 mM OxaPt poveikio). NK – žmogaus transkriptams nespecifinių siRNR mišinys; p62 – *SQSTM1* transkriptui specifinė siRNR. Pateikta vidurkis + SD, n = 3.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **V. Žitkutė**, A. Jasinevičius, G. Vaitiekaitė, E. Kukcinavičiūtė, B. Aleksandravičiūtė, E. Eidėnaitė, L. Sudeikis, V. Jonušienė, A. Sasnauskienė. The role of p62 in cell death and survival of 5-fluorouracil and oxaliplatin-resistant colorectal cancer cells. *J Cell Biochem*, 124; 2023; 1779-1791. DOI: 10.1002/jcb.30488

2. **V. Žitkutė**, E. Kukcinavičiūtė, V. Jonušienė, V. Starkuvienė-Erfle, A. Sasnauskienė. Differential effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin on autophagy in chemoresistant colorectal cancer cells. *J Cell Biochem*, 123; 2022; 1103-1115. DOI: 10.1002/jcb.30267

KITOS PUBLIKACIJOS

1. D. Gabrielaitis[#], **V. Žitkutė**[#], L. Saveikytė, G. Labutytė, M. Skapas, R. Meškys, V. Časaitė, S. Sasnauskienė[†], U. Neniškytė[†]. Nanotubes from bacteriophage tail sheath proteins: internalisation by cancer cells and macrophages. *Nanoscale advances*, 5; 2023; 3705-3716. DOI: 10.1039/D3NA00166K

2. E. Siavrienė, G. Petraitytė, V. Mikštienė, Ž. Maldžienė, A. Sasnauskienė, **V. Žitkutė**, L. Ambrozaitytė, T. Raščelis, A. Utkus, V. Kučinskas, E. Preikšaitienė. Molecular and Functional Characterisation of a Novel Intragenic 12q24.21 Deletion Resulting in MED13L Haploinsufficiency Syndrome. *Medicina (Kaunas)*; 59; 2023. DOI: 10.3390/medicina59071225

3. P. Grigaitis, V. Jonušienė, **V. Žitkutė**, J. Dapkūnas, D. Dabkevičienė, A. Sasnauskienė. Exogenous interleukin-1alpha signaling negatively impacts acquired chemoresistance and alters cell adhesion molecule expression pattern in colorectal carcinoma cells HCT116. *Cytokine*. 114; 2019; 38-46. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.11.031

[#] Vienodai prisidėjo prie pirmosios autorystės

[†] Vienodai prisidėjo prie paskutinės autorystės

PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

DISERTACIJOS RENGIMUI NAUDOTŲ PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

1. **V. Žitkutė**, E. Kukcinavičiūtė, V. Jonušienė, V. Starkuvienė-Erfle, A. Sasnauskienė. “Functional importance of core autophagy genes for chemoresistance of colorectal cancer cells HCT116”. Conference “VitaScientia”, 2020, Vilnius, Lietuva.
2. **V. Žitkutė**, E. Kukcinavičiūtė, D. Dabkevičienė, V. Jonušienė, V. Starkuvienė-Erfle, A. Sasnauskienė. „The Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin on Autophagy in Chemoresistant Colorectal Carcinoma Cells HCT116“. International FEBS3+ conference, 2019, Ryga, Latvija.
3. **V. Žitkutė**, E. Kukcinavičiūtė, D. Dabkevičienė, V. Jonušienė, V. Starkuvienė-Erfle, A. Sasnauskienė. „The Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin on Autophagy in Chemoresistant Colorectal Carcinoma Cells HCT116“. International Conference of Life Sciences “The COINS”, 2019, Vilnius, Lietuva.
4. A. Sasnauskienė, **V. Žitkutė**, V. Jonušienė. Identification of autophagy molecular targets to reduce chemoresistance of colorectal cancer cells. ECDO&EATI Joint Annual Conference. 2023, Paryžius, Prancūzija.
5. A. Sasnauskienė, **V. Žitkutė**, A. Jasinevičius, E. Kukcinavičiūtė, V. Jonušienė. „The role of autophagy in acquired chemoresistance of colorectal cancer cells“. Arqus RFF “Healthy aging from a multidisciplinary perspective“, 2022, Vilnius, Lietuva.

KITI PRANEŠIMAI

1. S. Sasnauskienė, **V. Žitkutė**, V. Časaitė, „Molecular and cellular aspects of intracellular delivery of bacteriophage-derived nanoparticles“, 3rd Baltic Biophysics Conference, 2022, Vilnius, Lietuva.

STAŽUOTĖS

BioQuant, Heidelbergo universitetas, Heidelbergas, Vokietija, 2017-2018.

PEDAGOGINĖ VEIKLA

1. Laboratorinių darbų „Molekulinės biologijos laboratoriniai darbai“ vedimas molekulinės biologijos bakalauro studijų studentams, 2022-iki dabar.
2. Kurso „Molecular Cell Biology“ pratybų vedimas molekulinės biologijos magistro studijų studentams, 2021-iki dabar.
3. Vadovavimas molekulinės biologijos bakalauro studijų studentėms Justės Navickaitės (2021), Bernadetos Aleksandravičiūtės (2022) ir Guodos Vaitiekaitės (2024) baigiamiesiems darbams.

DALYVAVIMAS MOKSLINIUOSE PROJEKTUOSE

1. EMBL-PI asocijuotas projektas „Delivery of RNPs and off-targets“, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, EMBL partnerystės institutas, 2022-2023.
2. „Application of an integrated approach for the investigation of genetic causes of rare inherited disorders“. Lietuvos mokslo taryba, S-MIP-21-15. Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Žmogaus ir medicininės genetikos katedra, 2021-2023.
3. „CRISPR-Cas13 technologijos taikymas tiriant atsparumą chemoterapiniams vaistams“. Vilniaus universiteto mokslo skatinimo fondas, MSF-JM-2/2021. Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas, 2021-2022.
4. „Self-assembling Phage Proteins for Targeted Nanomedicine“. Lietuvos mokslo taryba, S-SEN 20-4. Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biochemijos institutas, 2020-2021.
5. „A systems biology approach to analyze the functional interaction of protein coding RNAs and non-coding RNAs“. German Federal Ministry of Education and Research (BMBF). BioQuant, Heidelbergo universitetas, Heidelbergas, Vokietija

CURRICULUM VITAE

Vardas pavardė Vilmantė Žitkutė
Adresas Gyvybės mokslų centras, Saulėtekio al. 7, 10257,
Vilnius, Lietuva
El. pašto adresas vilmante.zitkute@gf.vu.lt

IŠSILAVINIMAS

- 2017-2021 **Doktorantūros studijos**, gamtos mokslai, biochemija, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2015-2017 **Magistro studijos**, molekulinė biologija, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2011-2015 **Bakalauro studijos**, molekulinė biologija, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra.

DARBINĖ VEIKLA

- 2021-dabar **Jaunesnioji asistentė/lektorė**, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2021-2023 **Jaunesnioji mokslo darbuotoja**, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas.
2022-2023 **Jaunesnioji mokslo darbuotoja (tyrėja)**, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, EMBL partnerystės institutas.
2021-2023 **Jaunesnioji mokslo darbuotoja**, Vilniaus universitetas, Medicinos fakultetas, Žmogaus ir medicininės genetikos katedra.
2020-2021 **Specialistė**, Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biochemijos institutas.
2017-2018 **Vizituojanti tyrėja**, Heidelbergo universitetas, BioQuant, Heidelbergas, Vokietija.
2014-2016 **Specialistė**, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra.

PADĖKA

Yra tiek daug žmonių, kuriems norėčiau padėkoti už pagalbą, patarimus, palaikymą, išklusimą ar tiesiog buvimą šalia, kai to reikėjo, bet čia paminėsiu labiausiai prisidėjusius prie šio darbo atsiradimo.

Pirmiausia norėčiau padėkoti prof. dr. Vidai Kirvelienei už įdomias paskaitas, kurios ir paskatino pradėti mokslinę kelionę po ląstelės pasaulį, bei už suteiktą galimybę prisijungti prie Ląstelės biochemijos grupės. Be galo esu dėkinga darbo vadovei doc. dr. Aušrai Sasnauskienei, su kuria kartu tiriame ląstelės pasaulį jau dvylika metų. Ačiū už pagalbą ruošiant disertaciją, mokymą, kantrybę, palaikymą, supratingumą ir šiltus pokalbius. Kiekvienam doktorantui norėčiau palinkėti turėti tokią vadovę kaip Aušra!

Taip pat norėčiau padėkoti prof. dr. Vytautei Starkuvienei-Erfle už suteiktą galimybę tobulėti, pagalbą ir šiltą priėmimą stažuotės metu. Also, I would like to thank to my colleagues from BioQuant Juergen Beneke, dr. Ruben Bulkescher and Nina Beil for help and enjoyable time.

Ačiū BTI Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus kolegoms už leidimą naudotis spektrofotometru ir jaukią kaimynišką nuotaiką darbe. Ačiū kolegoms iš BChI Bandomųjų gyvūnų laboratorijos už BCL2 antikūną ir už šiltą bendravimą.

Nuoširdus ačiū už patarimus, pagalbą ir palaikymą doc. dr. Violetai Jonušienei ir dr. Neringai Daugelavičienei. Kolegėms Gundai Petraitytei, Vidai Piskarskienei ir Ramutei Pagalytei dėkoju už išklusimą ir palaikymą. Esu dėkinga draugams dr. Eglei Kukcinavičiūtei ir Andriui Jasinevičiui už pagalbą darbuose ir išklusimą. Ačiū mano studentėms Justei Navickaitei, Bernadetai Aleksandravičiūtei ir Guodai Vaitiekaitei. Jūsų rankos nemažai prisidėjo prie šios disertacijos.

Norėčiau padėkoti draugams, be kurių man būtų buvę sunku įveikti šį „Everestą“. First, thank you dr. Manuela Nickl and dr. Julia Fakhiri for all pleasant memories. Without you staying in Heidelberg would not be so joyful. Už didžiulį palaikymą net būnant toli ačiū dr. Gintvilei Valinčiūtei, dr. Elenai Purlytei ir dr. Kotrynai Simutis. Už motyvacinius pokalbius ir pagalbą redaguojant disertacijos tekstą ačiū Algirdui Mikšiui ir dr. Renatui Krasauskui. Už lietuvių kalbos žinias ir patarimus ačiū Birutei Grašytei-Black.

Labai džiaugiuosi, kad šiame kelyje turėjau draugę, su kuria galėjome kartu koja kojon judėti link finišo tiesiosios. Ačiū dr. Gretai Leonavičienei, kad šią kelionę įveikėme kartu.

Be galo esu dėkinga draugei Vitalijai Paukštei už palaikymą, išklusimą, motyvacijos kėlimą, buvimą šalia liūdniausiais ir linksniausiais šios „kelionės“ momentais.

Nuoširdus ačiū tėvams už suteiktą galimybę mokytis, o ypač mamai Virginijai už palaikymą ir išklausymą. Broliams Zigmantui ir Eimantui norėčiau padėkoti už įkvėpimą mokytis gamtos mokslų ir pagalbą judant mokslo keliu. Sesei dr. Linai ačiū už palaikymą, išklausymą ir už tai, kad skatino pabaigti. Taip pat dėkoju brolių ir sesės šeimoms už palaikymą ir už neleidimą pamiršti, jog reikia atrasti laiko ir mažiausiems mūsų šeimos nariams, kurie man buvo lyg mažos saulytės tarp niūrių darbo debesų. Norėčiau padėkoti ir vyro tėvams bei brolio šeimai, kurie taip pat mane palaikė šiame kelyje.

Labiausiai norėčiau padėkoti mano didžiausiam gyvenimo ramsčiui ir palaikytojui – vyrui Kristupui. Ačiū, kad kentei, palaikėi, išklausei, visada buvai šalia ir skatinai judėti tik į priekį! Be tavęs šis laikotarpis būtų buvęs neapsakomai sunkesnis. Taip pat ačiū demotyvatoriui šuniui Appui, kuris blaškė ir tuo pačiu džiugino mane bei vertė atsitraukti nuo ekrano.

Ir pabaigai. Kai kurie draugai sakė, kad aš esu įkvėpimas jiems, bet iš tikro, jie buvo įkvėpimas man, nes skatino judėti tik į priekį ir jų nenuvilti. Ačiū!

UŽRAŠAMS

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