VILNIAUS UNIVERSITETAS

VAIDOTAS STANKEVIČIUS

Mikroaplinkos įtakos vėžinių ląstelių atsakui į jonizuojančiąją spinduliuotę transkriptominis tyrimas

Daktaro disertacijos santrauka Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2016

Daktaro disertacija rengta 2011-2015 m. Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete bei Nacionaliniame vėžio institute ir ginama eksternu.

Mokslinis vadovas – prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P). 2011-2015 m.

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P). 2016 m.

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas – prof. dr. Arvydas Skeberdis (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P). Nariai:

dr. Vydmantas Atkočius (Nacionalinis vėžio institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P);

prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04P);

dr. Vytautė Starkuvienė (Heidelbergo universitetas, Vokietija, fiziniai mokslai, chemija – 03P).

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2016 m. gruodžio 16 d. 13.00 val. Jungtiniame gyvybės mokslų centro R-102 auditorijoje (Saulėtekio 7, LT-10222, Vilnius, Lietuva).

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2016 m. lapkričio 16 d.

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

VILNIUS UNIVERSITY

VAIDOTAS STANKEVIČIUS

DOSE DELIVERY AND MICROENVIRONMENT DEPENDENT TRANSCRIPTOMIC PROFILES OF TUMOUR CELLS EXPOSED TO IONIZING RADIATION

Summary of doctoral dissertation Physical sciences, biochemistry (04 P)

Vilnius, 2016

The work presented in doctoral dissertation has been carried out at Vilnius university Department of Natural sciences and Nacional Cancer Institute during 2011-2015.

Scientific supervisor

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P) 2011-2015.

Scientific advisor

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P) 2016.

The doctoral dissertation will be defended at the Coucncil of Biochemistry science direction of Vilnius University

Chairman - prof. dr. Arvydas Skeberdis (Lithuanian University of Health Sciences, physical sciences, biochemistry – 04P). Members:

dr. Vydmantas Atkočius (National cancer institute, biomedical sciences, biology - 01B);

prof. dr. Vilmantė Borutaitė (Lithuanian University of Health Sciences, physical sciences, biochemistry – 04P);

prof. dr. Rūta Navakauskienė (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04P);

dr. Vytautė Starkuvienė (Heidelberg University, Germany, physical sciences, chemistry -03P).

The thesis defense will take place at the open meeting held by Biochemistry Sciences defense board at 1 pm on 16th December, 2016 in the auditorium R-102, Vilnius University Life Sciences Center. Address: Sauletekio 7, Vilnius

The summary of doctoral dissertation was sent on the 16th of November, 2016

Thesis is available at the library of Vilnius University and at VU link <u>www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius</u>

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	6
ĮVADAS	7
MEDŽIAGOS IR METODAI	10
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	14
IŠVADOS	
MOKSLINIŲ DARBŲ SARAŠAS	
PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE	
PADĖKA	
SUMMARY	
LITERATŪROS SĄRAŠAS	

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

2D – dvidimensinė, monosluoksnį formuojanti ląstelių kultūra

3D - tridimensinė (erdvinė) ląstelių kultūra

DLD1 – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija

ECM – tarpląstelinis užpildas

FD – frakcionuotos dozės poveikis JS

Gy – Grėjus, SI sistemos vienetas

HT29 – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija

JS – jonizuojančioji spinduliuotė

KEGG – Duomenų bazių kolekcija Kioto genų ir genomų enciklopedija (angl. Kyoto encyclopedia of genes and genomes)

LLC1- pelių Lewis plaučių karcinomos ląstelių linija

lr-ECM – lamininu praturtintas tarpląstelinis užpildas

MAPK – mitogenų aktyvuojamos baltymų kinazės

TL-PGR – tikro laiko (kiekybinė) PGR

VD – vienkartinės dozės poveikis JS

ĮVADAS

Praėjus daugiau kaip 100 metų nuo pirmųjų bandymų jonizuojančiąją spinduliuotę pritaikyti medicinoje, atradimai, padaryti radiobiologijos srityje, padėjo pamatus šiuolaikinėje spindulinėje priešvėžinėje terapijoje naudojamiems metodams (Purdy 2008). Kartu su įvairiomis technologinėmis naujovėmis, šiuolaikinė spindulinė terapija – vienas tiksliausių vėžinių susirgimų gydymo būdų, leidžiančių kontroliuoti jonizuojančiosios spinduliuotės (JS) dozę atsižvelgiant į individualias naviko charakteristikas ir prognozuojamą organizmo atsaką. JS skiriama maždaug pusei vėžiu sergančių pacientų, atskirai arba kartu su kitais metodais (chirurgija, chemoterapija, hormonų terapija) (Delaney et al. 2005).

Spindulinė terapija (ST) yra grindžiama žalingu JS poveikiu vėžiniams dariniams, kurie dažniausiai pasižymi didesniu jautrumu JS (Barcellos-Hoff et al. 2005, Lord and Ashworth 2012). Rentgeno spinduliais apšvitinus naviką sudarančias ląsteles, vyksta DNR molekulių jonizacija, kurios metu susidaro įvairios DNR pažaidos, lemiančios terapijos citotoksinį efektyvumą (Barcellos-Hoff et al. 2005). Tačiau spindulinės terapijos metu pažeidžiama ne tik vėžinių, bet ir naviką supančių sveikų audinių ląstelių DNR. Siekiant apsaugoti sveikų audinių ląsteles nuo neigiamo JS poveikio, dažniausiai yra taikoma frakcionuotos dozės JS terapija, kurios metu onkologinėmis ligomis sergantys pacientai kas 24 valandas penkias dienas per savaitę yra švitinami nedidelės dozės (1,8-2 grėjų) JS frakcijomis, kurios vėžinėse ląstelėse sukelia pakankamai DNR pažaidų, tačiau nėra letalios pačioms jautriausioms organizmo ląstelėms (Feofanova et al. 2014). Tikimasi, kad sveikų audinių funkcijos per 24 valandas spėja atsistatyti dėl žymiai greitesnio ir efektyvesnio DNR pažaidų taisymo nevėžinėse ląstelėse. Tuo tarpu vėžinės ląstelės dėl nevaldomo dalijimosi nespėja ištaisyti susidariusių DNR pažaidų, kurios galiausiai aktyvina ląstelės žūties kelius.

Deja, pastebėta, kad po periodiško frakcionuotos dozės poveikio JS, vėžinių ląstelių jautrumas tolesnei spinduliuotei sumažėja ir ilgainiui vėžinės ląstelės įgyja atsparumą JS poveikiui. Nustatyta, kad vėžinės ląstelės geba aktyvinti įvairius molekulinius atsako į DNR pažaidas mechanizmus (Ogawa et al., 2006). Dėl to kinta vėžinių ląstelių ciklo eiga, slopinama replikacija bei dalijimasis, aktyvinami DNR pažaidų taisymo mechanizmai ir slopinama programuota ląstelės žūtis. Visa tai didina vėžinių ląstelių atsparumą spindulinei terapijai. Akivaizdu, kad ST efektyvumas itin priklauso nuo įvairių molekulinių procesų, kurie yra aktyvinami ląstelės atsako į jonizuojančiąją spinduliuotę metu. Todėl, siekiant padidinti priešvėžinės spindulinės terapijos efektyvumą ir panaudoti turimas priešvėžinės terapijos priemones, būtina charakterizuoti ir įvertinti molekulinius procesus, dalyvaujančius vėžinių ląstelių atsako į spindulinę terapiją metu.

Siekiant išsiaiškinti molekulinis procesus, vykstančius vėžinių ląstelių atsako į JS metu ir lemiančius atsparumą priešvėžinei spindulinei terapijai, tyrimams laboratorijose svarbu pasirinkti tokią modelinę sistemą, kuri geriausiai atspindėtų naviko ląstelėse *in vivo* vykstančius procesus. Tam tikslui dažniausiai naudojamos monosluoksnio dvimatės (2D) ląstelių kultūros. Tačiau pastebėta, kad šios modelinės sistemos turi trūkumų – 2D lastelių kultūros nepasižymi audiniams būdingu kompleksiškumu ir neatkartoja procesų, vykstančių naviko mikroaplinkoje (Nyga et al. 2011), todėl tyrimams vis dažniau pasirenkamos erdvinės (3D) modelinės sistemos, kuriose kultivuojamos ląstelės gali pasižymėti daugeliu savybių, būdingų naviko ląstelėms *in vivo*. Kultivuojant ląsteles tokiose modelinėse sistemose, skirtingai nei 2D ląstelių kultūrose, pastebimas ląstelių heterogeniškumas, skirtingas augimo ir dalijimosi greitis, taip pat pakitusi ląstelių morfologija ir genų raiška (Storch ir Cordes, 2012). Visi šie skirtumai gali lemti ir skirtingą vėžinių ląstelių atsaką į terapinį poveikį. Tikėtina, kad vėžinių ląstelių atsakas į citotoksinį poveikį, įvertintas naudojant 3D ląstelių kultūrų modelį, geriau atspindės naviko ląstelių atsaką *in vivo*.

Taigi, siekiant nustatyti potencialius molekulinius spindulinės terapijos tobulinimo taikinius, **šio darbo tikslas** buvo įvertinti visuminės genų ir mikro RNR raiškos pokyčius vėžinėse ląstelėse po poveikio vienkartinės ir frakcionuotos dozės jonizuojančiąja spinduliuote.

Darbo uždaviniai:

- 1. Įvertinti LLC-1 ląstelių gyvybingumo pokyčius po vienkartinės ir frakcionuotos dozės JS poveikio, ląsteles kultivuojant monosluoksnio modelinėje sistemoje;
- 2. Įvertinti visuminės genų ir miRNA raiškos pokyčius pelių Lewis plaučių karcinomos LLC1 ląstelėse, kultivuotose monosluoksnį formuojančioje ląstelių kultūroje, po vienkartinės ir frakcionuotos dozės JS poveikio;
- Įvertinti visuminės genų ir miRNA raiškos pokyčius pelių Lewis plaučių karcinomos LLC1 ląstelėse, kultivuotose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D;
- 4. Įvertinti visuminės genų raiškos pokyčius žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelėse, kultivuotose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D;
- 5. Įvertinti žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelių gyvybingumo pokyčius po vienkartinės ir frakcionuotos dozės JS poveikio, ląsteles kultivuojant monosluoksnio ar tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje;
- Įvertinti visuminės genų raiškos pokyčius žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelėse, kultivuotose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, po poveikio vienkartinės ir frakcionuotos dozės JS;
- 7. Nustatyti potencialius molekulinius taikinius veiksmingesnės spindulinės terapijos kūrimui.

Mokslinis naujumas

Šiame darbe ląstelių atsako į vienkartinės arba frakcionuotos dozės jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio molekulinių procesų išaiškinimui mes panaudojome viso genomo transkriptominę analizę. Ankstesni panašūs efektyvesnės spindulinės terapijos kūrimo siekiai atskleidė reikšmingus ląstelių atsako į JS poveikį skirtumus kai ląstelės buvo kultivuojamos *in vitro* ar navikų ksenograftuose (Camphausen et al. 2005, Tsai et al. 2007). Bet tik šiame tyrime mes pirmą kartą panaudojome singeninę pelės Lewis plaučių karcinomos LLC1 ląstelių linijos modelinę sistemą. Nors tyrimo rezultatai patvirtino ankstesnius pastebėjimus, kad ląstelių atsakas į JS poveikį priklauso nuo poveikio tipo (vienkartinės ar frakcionuotos dozės poveikis), tik šiame darbe buvo atlikta išsami genų ir mikro RNR raiškos pokyčių analizė ląstelėse po skirtingo poveikio JS tipo. Taip pat mūsų tyrimas atskleidė, kad *in vitro* kultūroje

augintų ląstelių atsakas į frakcionuotos dozės JS poveikį neatspindi singeninių navikų ląstelių atsako į tokį patį poveikį.

Kitas naujas mūsų tyrimo rezultatas – panaudoję visuminę transkriptominę analizę mes nustatėme, kad genų, dalyvaujančių ląstelių adhezijos, MAPK ir su imuniniu atsako keliuose, raiška priklauso nuo tarpląstelinio užpildo, nepriklausomai nuo darbe naudotų ląstelių prigimties (naudojant tiek pelės LLC1 tiek žmogaus DLD1 ar HT29 ląsteles). Šiame tyrime atliktas ląstelių kultūrų ir singeninių navikų palyginimas atskleidė, kad genų ir miRNR raiška ne monosluoksnį formuojačioje, o erdvinėje ląstelių kultūroje augintose LLC1 ląstelėse atitinka raišką navikuose.

Be to, savo tyrime pirmą sykį pademonstravome, kad frakcionuotos dozės JS poveikis nuo tarpląstelinio užpildo priklausomu būdu žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelėse DLD1 ar HT29 atitinkamai aktyvina su ląsteliu išgyvenimu susijusių ląstelės dalijimosi ciklo kontrolės/DNR pažaidų taisymo arba imuninio atsako genus.

Apibendrinant, šie nauji duomenys ne tik atskleidė bendrų nuo tarpląstelinio užpildo priklausomų reguliacinių tinklų vėžinėse ląstelėse egzistavimą, bet ir nurodė veiksmingesnės priešvėžinės spindulinės terapijos kūrimo kryptis.

Ginamieji teiginiai

- 1. Pelės Lewis plaučių karcinomos LLC1 ir žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelių atsakas į JS priklauso nuo apšvitos tipo;
- 2. Ląstelių atsakas į poveikį frakcionuotos dozės JS monosluoksnį formuojačiose LLC1 ląstelėse neatspindi singeninio naviko atsako *in vivo*;
- 3. Genų, dalyvaujančių MAP kinazių, ląstelių adhezijos ir imuninio atsako signaliniuose keliuose, raiška tiek pelės (LLC1), tiek žmogaus (DLD1 ir HT29) ląstelėse priklauso nuo tarpląstelinio užpildo;
- 4. Atsakas į frakcionuotos dozės jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelėse priklauso nuo tarpląstelinio užpildo.

MEDŽIAGOS IR METODAI

Medžiagos. Darbe naudotos medžiagos, pirktos iš Carl ROTH, Biochrom, Sigma ir ThermoFisher Scientific.

Ląstelių linijos ir pelių linija. LLC1 – pelės Lewis plaučių karcinomos ląstelių linija (ATCC® ląstelių banko numeris CRL-1642TM). Ląstelės kultivuojamos DMEM terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino, 3,5 g/l gliukozės, 2 mM L-alanil-L-glutamino, 3,7 g/l NaHCO₃. **DLD1** – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos Duke C tipo ląstelių linija (ATCC® numeris CCCL-221TM). Ląstelės kultivuojamos RPMI terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/mL penicilino, 100 µg/mL streptomicino, 3,5 g/L gliukozės, 2 mM L-alanil-L-glutamino, 3,7 g/L NaHCO₃. **HT29** – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija (ATCC® numeris HTB-38TM). Ląstelės kultivuojamos DMEM terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/mL penicilino, 100 µg/mL,streptomicino, 3,5 g/L gliukozės, 2 mM L-alanil-L-glutamino, 3,7 g/L NaHCO₃. **C57BL/6 pelės** (Biochemijos institutas, Lietuva) – tyrimams *in vivo* vyriškos lyties linijinės 10-12 savaičių amžiaus ir 19-22 g kūno masės pelės. Gyvūnai buvo naudojami pagal Lietuvos gyvūnų globos draugijos rekomendacijas.

Ląstelių kultivavimo 2D ir 3D kultūrose eksperimento planas. Monosluoksnį formuojančioje 2D modelinėje sistemoje ląstelės kultivuojamos 25 cm² flakonuose. Ląstelių užsėjimo tankis: DLD1 ir HT29 – $3x10^4$ ląst/cm²; LLC1 – 2,5x10⁴ ląst./cm². 3D modelinėje sistemoje ląstelės kultivuojamos 1 mL 0,5 mg/mL tarpląsteliniu užpildu (Geltrex) praturtintoje mitybinėje terpėje, 24 šulinėlių plokštelėse, prieš tai šulinėlių dugną padengus plonu 1% agarozės gelio sluoksniu (kad būtų išvengta kultivuojamų ląstelių adhezijos prie šulinėlio dugno). Ląstelių užsėjimo tankis: DLD1 ir HT29 – $5x10^4$ ląst./mL; LLC1 – 2,5x10⁴ ląst./mL. Praėjus 48 val. po užsėjimo, invertuotu bei konfokaliniu mikroskopais įvertinami ląstelių morfologijos pokyčiai bei išgryninama RNR.

Švitinimo JS eksperimento planas. Ląstelės buvo švitinamos vienkartinės dozės iki 10 Gy JS arba frakcionuotos dozės 5x2 Gy JS (2 Gy frakcijos 5 kartus kas 24 val.) naudojant Varian 6MV Clinac 600 C/D linijinį greitintuvą. 2D atveju ląstelės užsėtos 25 cm² flakonuose (RNR gryninimui) arba 6 šulinėlių plokštelėse (klonogeninei analizei). Transkriptominės analizės atveju lastelių užsėjimo tankis buvo: DLD1 ir HT29 – 3x10⁴ ląst/cm² ir $0,4x10^4$ ląst/cm² (VD ir FD, atitinkamai); LLC1 – $2,5x10^4$ ląst./cm² ir $0,35x10^4$ ląst/cm² (VD ir FD, atitinkamai). 3D atveju ląstelės kultivuotos 24 šulinėlių plokštelėse (RNR gryninimui) arba šulinėlių plokštelėse (klonogeninei 96 analizei). Transkriptominės analizės atveju DLD1 ir HT29 ląstelių užsėjimo tankis buvo 5 x10⁴ and 1 x10⁴ last./mL (VD ir FD, atitinkamai). RNR buvo išgryninta praėjus 4 val. po JS poveikio. Pelių navikai švitinti laikantis tos pačios eksperimentų plano schemos.

Klonogeninė analizė. 2D kultūros atveju ląstelių suspensija užsėjama 6 šulinėlių plokštelėse (500-10000 ląstelių vienam šulinėliui, priklausomai nuo švitinimo dozės) 24 val. pries švitinimą. Ląstelės veikiamos vienkartinės arba frakcionuotos dozės JS. Suminė JS apšvita pasirenkama pagal eksperimento planą. Praėjus 8 dienoms po švitinimo pradžios, ląstelės fiksuojamos 1 mL 50% metanolio ir nudažomos 1 mL 0,5% kristalinio violeto tirpalo. Susidariusios kolonijos (>50 ląstelių vienoje kolonijoje) suskaičiuojamos ir įvertinamas gyvybingumas. 3D kultūros atveju ląstelių suspensija kultivuojama 1 mL 0,5 mg/mL tarpląsteliniu užpildu praturtintoje mitybinėje terpėje, 96

šulinėlių plokštelėse (500-1000 ląstelių vienam šulinėliui, priklausomai nuo švitinimo dozės), prieš tai šulinėlių dugną padengus plonu 1% agarozės gelio sluoksniu, 24 val. prieš švitinimą. Praėjus 8 dienoms po švitinimo pradžios susidariusios kolonijos (>50 ląstelių vienoje kolonijoje) suskaičiuojamos ir įvertinamas gyvybingumas.

Fluorescencinė mikroskopija. Ląstelės du kartus praplaunamos PBS ir kambario temperatūroje fiksuojamos 4% paraformaldehido (PFA) tirpale (ROTH) PBS'e. Fiksuotos ląstelės 3 kartus po 5 min. plaunamos PBS tirpalu, o tuomet permeabilizuojamos 3 min. inkubuojant ląsteles šaltame 0,1% Triton X-100 tirpale PBS'e. Ląstelės 30 min. kambario temperatūroje inkubuojamos su Alexa®633 Phaloidin (ThermoFisher Scientific) dažais, ištirpintais PBS'e su 1% BSA. Tada ląstelės 3 kartus praplaunamos PBS'e ir 3 min. inkubuojamos 5 μ g/ml Dapi (Sigma) tirpale PBS'e. Ląstelės 3 kartus praplaunamos PBS's ir perkeliamos ant objektinio stikliuko. Ant stilkiukų užlašinama Roti®-MountFluorCare (ROTH) fluorescencinės mikroskopijos terpės ir paruošti mėginiai analizuojami fluorescenciniu konfokaliniu mikroskopu (Zeiss 7Duo Live) naudojant imersinį 40x/1,3 objektyvą ir 405 nm bei 633 nm ilgio bangų sužadinimą.

RNR ir miRNR gryninimas. Genų raiškos pokyčių analizės atveju visuminė RNR, naudojama visuminės genų raiškos analizės metu, gryninama iš ~1 x 10⁶ ląstelių, naudojantis "GeneJET RNA Purification Kit" (ThermoFisher Scientific) rinkiniu, vadovaujantis gamintojo protokolu. Genų ir miRNR raiškos analizės atveju visuminė RNR, praturtinta trumpomis nekoduojančiomis RNR, naudojama visuminės miRNR raiškos analizės metu, gryninama iš ~1 x 10⁶ LLC1 ląstelių arba iš ~100 mg LLC1 naviko, naudojantis "mirVANA miRNA Isolation Kit" (Thermo Scientific) rinkiniu, vadovaujantis gamintojo protokolu. Abiem atvejais visuminės RNR kiekis ir grynumas nustatomas spektrofotometriškai (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), matuojant sugertį ties 260 nm ir nustatant $A_{260/280}$ ir $A_{260/230}$ santykius, o RNR kokybė įvertinama kapiliarine elektroforeze. Išgryninta RNR laikoma -70°C temperatūroje.

Visuminės RNR kokybės analizė kapiliarine elektroforeze. Kapiliarinė elektroforezė atliekama naudojant Agilent 2100 (Agilent Technologies) bioanalizatorių kartu su RNA 6000 Nano rinkiniu (Agilent Technologies), pagal gamintojo rekomenduojamą protokolą. Rezultatai analizuojami Agilent 2100 Expert ver. B.02.08 (Agilent Technologies) programa.

Mėginių visuminės genų raiškos tyrimams paruošimas. Antiprasminės informacinės RNR sintezei (aRNR) iš visuminės RNR naudojamas "MessageAmpTM II aRNA Amplification Kit" (ThermoFisher Scientific) rinkinys bei vadovaujamasi gamintojo rekomenduojamu protokolu. Gauta aRNR saugoma -70°C temperatūroje. Antiprasminė informacinė RNR žymima fluorescenciniais žymenimis (Cy3 ar Cy5, priklausomai nuo mėginio), "Arcturus® TURBO labelingTM CyTM3/CyTM5" (ThermoFisher Scientific) rinkinio pagalba, vadovaujantis gamintojo rekomenduojamu protokolu. Paruošiamas aRNR fragmentacijos mišinys: 825 ng Cy3 žymėtos aRNR (kontrolinio mėginio aRNR) ir 825 ng Cy5 žymėtos aRNR (tiriamojo mėginio aRNR) sumaišoma su 6 µl 10X blokavimo reagento ir 1,2 µl 25X fragmentacijos buferio. Iki galutinio 30 µl reakcijos mišinio tūrio pripilama H₂O be nukleazių. aRNR fragmentacija vykdoma tiksliai 30 min. 60°C temperatūroje. Fragmentacijos reakcija sustabdoma į reakcijos mišinį pridėjus 30 µl 2X GEx hibridizacijos buferio HI-RPM (Agilent Technologies). Reakcijos mišinys laikomas leduose. Hibridizacija atliekama automatizuotoje HS 400[™] Pro (Tecan) hibridizavimo stotyje, naudojant Agilent žmogaus arba pelės viso genomo oligonukleotidines 4x44k mikrogardeles (Agilent Technologies). Hibridizacijos programa:

- Mikrogardelės plaunamos 1 min 65°C Agilent prehibridizacijos buferiu.
- Į atitinkamas hibridizacijos kameras užnešama 55 μl hibridizacijai paruoštos aRNR.
- Hibridizacija vykdoma 17 val. 65°C, lėtai judinant hibridizacijos kameras.
- Mikrogardelės plaunamos GE 1 tirpalu po 1,5 min kambario temperatūroje.
- Mikrogardelės plaunamos GE 2 tirpalu po 1,5 min 37°C.
- Mikrogardelės džiovinamos N₂ atmosferoje, 2 min 30°C.

Mikrogardelės nedelsiant skenuojamos LS Reloaded[™] mikrogardelių skeneriu (Tecan) arba iki skenavimo saugomos kambario temperatūroje (tamsoje)

Mėginių visuminės miRNR raiškos tyrimams paruošimas. miRNR žymėjimui fluorescensine Cy3 žyme iš visuminės RNR, praturtintos trumpomis nekoduojančiomis RNR, naudojamas "miRNA Complete Labeling and Hyb Kit" (Agilent technologies) rinkinys bei vadovaujamasi gamintojo rekomenduojamu protokolu. Paruošiamas mišinys: visiškai išdžiovinti Cy3 hibridizacijos pažymėti miRNR mėginiai suspenduojami 18 µl H₂O be nukleazių, sumaišomi su 4,5 µl 10x GE blokavimo agento ir 22,5 µl 2x Hi-RPM hibridizacijos buferio. Tada hibridizacijos mišinys inkubuojamas 5 min 100°C temperatūroje, 5 min atvėsinamas ledų vonelėje ir ncentrifuguojamas 1 min. 12000 g jėga. Hibridizacija atliekama hibridizacijos krosnelėje (Agilent Technologies), naudojant Agilent pelės miRNR oligonukleotidines 8x15k mikrogardeles (Agilent Technologies). Hibridizacijos programa:

- Surenkamos hibridizacijos kameros.
- Į atitinkamas hibridizacijos kameras užnešama 45 μl hibridizacijai paruošto hibridizacijos mišinio.
- Hibridizacija vykdoma 20 val. 55°C, lėtai judinant (20 apsisukimų per min.) kameras hibridizacijos krosnelėje.
- Mikrogardelės plaunamos GE 1 tirpalu 5 min kambario temperatūroje.
- Mikrogardelės plaunamos GE 2 tirpalu 5 min 37°C.

Mikrogardelės nedelsiant skenuojamos Agilent SureScan mikrogardelių skeneriu (Agilent Technologies) arba iki skenavimo saugomos kambario temperatūroje (tamsoje).

Mikrogardelių skenavimas, gautų duomenų apdorojimas ir analizė. Visuminės genų raiškos mikrogardelės skenuojamos LS Reloaded[™] (Tecan) skeneriu 6 µm raiška, valdomu Array-Pro Analyzer ver. 4.5.1.73 (MediaCybernetics) programa. Kiekybiniam genų raiškos pokyčių įvertinimui naudojama ImaGene[™] ver. 9.0 (BioDiscovery) ir GeneSpring GX ver. 11.0 (Agilent Technologies) programos.

Visuminės miRNR raiškos mikrogardelės skenuojamos Agilent SureScan mikrogardelių skeneriu (Agilent Technologies) 6 µm raiška. Kiekybiniam genų raiškos įvertinimui naudojama Extraction Feature v10.7.3.1 software (Agilent Technologies) ir GeneSpring GX ver. 11.0 (Agilent Technologies) programos.

Mėginių genų ir miRNR raiškos tyrimams paruošimas. kDNR pirma grandinė sintetinama naudojantis "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Thermo Scientific) rinkiniu pagal gamintojo protokolą. Genų raiškos pokyčių analizės atveju: į mėgintuvėlį įpilama 1 μ g išgrynintos RNR, 1 μ l atsitiktinių heksamerinių pradmenų tirpalo ir iki 12 μ l pripilama H₂O be nukleazių. Tada į kiekvieną mėgintuvėlį pilama 8 μ l

reakcijos mišinio, kuris sudarytas iš: 4 μl 5X reakcijos buferio, 1 μM dNTP mišinio, 20 U ribonukleazių slopiklio tirpalo bei 20 U "RevertAid RT" atvirkštinės transkriptazės. Reakcija vykdoma "Labcycler" termocikleryje (SensoQuest GmbH) pagal programą: 5 min 25°C; 60 min 42°C; 10 min 70°C. Susintetinta kDNR laikoma -70°C. miRNR raiškos pokyčių analizės atveju: į mėgintuvėlį įpilama 200 ng išgrynintos RNR, 1 μM specifinių pradmenų tirpalo ir iki 12 μl pripilama H₂O be nukleazių. Tada į kiekvieną mėgintuvėlį pilama 8 μl reakcijos mišinio, kuris sudarytas iš: 4 μl 5X reakcijos buferio, 1 μM dNTP mišinio, 20 U ribonukleazių slopiklio tirpalo bei 20 U "RevertAid RT" atvirkštinės transkriptazės. Reakcija vykdoma "Labcycler" termocikleryje (SensoQuest GmbH) pagal programą: 20 min 25°C; 60 min. 37°C; 10 min. 70°C. Susintetinta kDNR laikoma -70°C.

Genų ir miRNR raiškos pokyčių įvertinimas realaus laiko kiekybinės PGR metodu. Kiekybinė PGR atlikta naudojantis "KAPA SYBR FAST qPCR Kit" rinkiniu (KAPA Biosystems) pagal gamintojo rekomenduojamą protokolą. Genų raiškos pokyčių analizės atveju bendras vienos reakcijos tūris – 10 µl: 5 µL 2x KAPA SYBR FAST qPCR reakcijos mišinio, 1 µL 5 kartus skiestos kDNR, 0,2 µl 10 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinio ir 3,8 µl vandens be nukleazių. Reakcijos vykdomos 96 šulinėlių plokštelėse (Bio-Rad) naudojant "Mastercycler® ep realplex4 " termociklerį (Eppendorf) pagal programą:

- Polimerazės aktyvacija 95°C temp. 3 min. (1 ciklas);
- Denatūracija 95°C temp. 3 s ir prilydymas ir ilginimas 60°C temp. 30 s (40 ciklų).

miRNR raiškos pokyčių analizės atveju bendras vienos reakcijos tūris – 10 μ l: 5 μ L 2x KAPA SYBR FAST qPCR reakcijos mišinio, 1 μ L 2 kartus skiestos kDNR, 0,2 μ l 10 μ M tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinio ir 3,8 μ l vandens be nukleazių. Reakcijos vykdomos 96 šulinėlių plokštelėse (Bio-Rad) naudojant "Mastercycler® ep realplex4" termociklerį (Eppendorf) pagal programą:

- Polimerazės aktyvacija 95°C temp. 3 min (1 ciklas);
- Preamplifikacija: denatūracija 95°C temp. 15 s, prilydymas 1 min at 55 °C ir ilginimas 30 s 60 °C temp. (3 ciklai)
- Denatūracija 95°C temp. 10 s ir prilydymas ir ilginimas 60°C temp. 30 s (32 ciklai).

kDNR amplifikacija matuojama pagal SYBR Green fluorescencijos lygį, registruojamos kiekvieno mėginio ribinio ciklo C_T vertės. Santykiniai genų raiškos pokyčiai apskaičiuojami $\Delta\Delta C_T$ metodu (Livak and Schmittgen 2001). Genų ir miRNR raiškos duomenų normalizavimui naudoti Hprt1 arba Gapdh (genų raiškos analizės atveju) arba SnoRNA-135 (miRNR raiškos analizės atveju) raiškos lygiai.

Bioinformatinė analizė. Funkcinė praturtinimo signaliniais keliais analizė atlikta (WEB-based naudojantis WebGestalt GEne SeT AnaLysis Toolkit: www.webgestalt.org) irankio ir KEGG duomenų bazės pagalba (Wang et al. 2013). taikiniu praturtinimo analizė atlikta naudojantis Diana Tools miRNR (www.Diana.imis.athena-innovation.gr) irankio pagalba (Vlachos et al. 2012. Paraskevopoulou et al. 2013).

Statistinė analizė. Visi eksperimentai pakartoti mažiausiai 3 kartus. Statistiniam rezultatų apdorojimui naudotos kompiuterinė "GraphPad Prism v.6" programa. Statisniam gautų rezultatų skirtumui įvertinti naudotas Stjudento kriterijus.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1. Genų ir miRNR raiškos pokyčiai LLC1 ląstelėse po poveikio JS

Šiame darbo etape buvo įvertinti: LLC1 ląstelių gyvybingumas po poveikio JS, visuminiai genų ir miRNR raiškos pokyčiai LLC1 ląstelėse praėjus 4 val. po poveikio vienkartinės dozės 2 Gy arba 10 Gy bei frakcionuotos dozės 5x2 Gy JS, lyginant su nešvitintomis ląstelėmis. Siekiant išsiaiškinti, kokiuose biologiniuose procesuose gali dalyvauti genai, kurių raiška kito LCC ląstelėse po švitinimo vienkartinės ar frakcionuotos dozės JS, buvo atlikta KEGG signalinių kelių praturtinimo analizė. Taip pat palyginome pasirinktų genų ir miRNR raiškos pokyčius LLC1 ląstelėse ir LLC1 navikuose po poveikio vienkartinės 10 Gy arba frakcionuotos 5x2 Gy dozių JS.

LLC1 ląstelių gyvybingumo pokyčiai po poveikio JS. Klonogeninės išgyvenamumo analizės rezultatai parodė, kad LLC1 ląstelės yra jautresnės vienkartinės dozės poveikiui nei švitinant frakcionuotos dozės JS. Po poveikio vienkartinės dozės 2 Gy arba 10 Gy JS, ląstelių, formavusių kolonijas, dalis buvo atitinkamai 0.622 ± 0.041 bei 0.0011 ± 0.00051 , o po poveikio frakcionuotos dozės 5x2 Gy JS LLC1 ląstelių santykinis gyvybingumas sumažėjo iki 0.1981 ± 0.0465 .

Visuminės genų raiškos pokyčiai LLC1 ląstelėse po poveikio JS. Visuminės genų raiškos analizė parodė, kad poveikis JS LLC1 ląstelėse sukėlė 2294 genų raiškos pokyčius, praėjus 4 val. po švitinimo, lyginant su nešvitintomis ląstelėmis (raiškos pokyčio lygis kartais > 1,5; p < 0,05) (1 pav.). Mikrogardelių analizė taip pat parodė, kad genų raiškos pokyčiai LCC1 ląstelėse priklauso nuo švitinimo JS tipo. Vienkartinės 2 Gy dozės poveikis LLC1 ląstelėse sukėlė 422 genų raiškos pokyčius, o tuo tarpu po poveikio vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozių atitinkamai reikšmingai pakito 1258 ir 1465 genų raiška. Venn'o diagramų analizė atskleidė, kad 145 genų raiška buvo vienodai pakitusi LCC1 ląstelėse, po visų poveikio JS režimų.

KEGG signalinių kelių praturtinimo analizė. KEGG analizė parodė (**1 lentelė**), kad poveikis JS LLC1 ląstelėse sukelia genų, dalyvaujančių ląstelės ciklo ir p53 signaliniuose keliuose, reikšmingus raiškos pokyčius. Nustatyta, kad po poveikio vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozių JS LLC1 ląstelėse ženkliai kinta raiška genų, dalyvaujančių apoptozės ir DNR replikacijos. DNR pažaidų ir imuninio atsako



1 pav. Venn'o diagramos. Venn'o diagramos parodo kiekį genų ir miRNR (pokytis kartais > 1,5 ir p < 0,05), kurių raiška reikšmingai pakito LLC1 ląstelėse po poveikio vienkartinės (2 ir 10 Gy) ir frakcionuotos dozės (5x2 Gy) JS.

Kategorija	2 Gy		10 Gy		5x2 Gy	
	Genai	p reikšmė	Genai	p reikšmė	Genai	p reikšmė
Su vėžiu susiję signaliniai keliai	11	0.0005	38	1.76E-16	53	3.50E-27
Lastelės ciklas	5	0.0069	25	2.88E-16	28	3.48E-18
P53 signalinis kelias	10	2.37E-09	15	2.07E-10	24	2.46E-20
MAPK signalinis kelias	0	NS	20	2.73E-06	29	8.91E-11
Citokino-citokino receptorių saveika	7	0.0066	19	2.84E-06	26	1.35E-09
DNR replikacija	0	NS	8	2.09E-06	10	3.89E-08
TGF-beta signalinis kelias	3	NS	14	1.92E-08	14	6.72E-08
Apoptozė	6	0.0007	16	3.41E-10	17	1.40E-10
VEGF signalinis kelias	0	NS	9	7.35E-05	12	8.71E-07
Hepatito C kelias	0	NS	16	1.63E-07	19	4.13E-09
Nekomplementarių nukleotidų reparacija	0	NS	7	1.10E-06	8	1.20E-07
Nukleotidų ekscizinė reparacija	0	NS	7	7.45E-05	12	1.72E-09
Wnt signalinis kelias	0	NS	9	0.0076	15	1.24E-05
Chemokinų signalinis kelias	0	NS	15	2.07E-05	16	2.50E-05
B ląstelių receptorių signalinis kelias	5	0.0022	11	1.96E-06	10	3.51E-05
Bazių ekscizinė reparacija	2	NS	8	3.42E-06	7	7.77E-05
Jak-STAT signalinis kelias	6	0.0035	14	1.13E-05	14	4.64E-05
Insulino signalinis kelias	4	NS	17	2.63E-08	17	1.20E-07
Į RIG-I panašių receptorių signalinis kelias	0	NS	2	NS	6	0.01
Į Toll panašių receptorių signalinis kelias	0	NS	7	0.008	9	0.0013
Homologinė rekombinacija	0	NS	5	0.0006	5	0.0009

1 Lentelė. KEGG funkcinės praturtinimo signaliniais keliais analizės rezultatai

KEGG kategorijos, į kurias įėjo ne mažiau 5 genai buvo laikomos reikšmingai praturtintos, kurių p<0.05. NS, nereikšmingas įvertis.

keliuose. Praturtinimo analizės rezultatai taip pat atskleidė, kad po poveikio vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozių JS LLC1 ląstelėse reikšmingai kito genų, susijusių su MAPK, TGF-β, VEGF, WNT ir insulino signaliniais keliais, raiška.

Klasterinė analizė. Genų, dalyvaujančių p53, ląstelės ciklo, apoptozės ir imuninio atsako keliuose, pokyčiai LLC1 ląstelėse po poveikio vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS vizualizuoti klasterine analize (**2 pav.**).

Klasterinės analizės rezultatai atskleidė, kad iš viso 27 genų, susijusių su p53 signaliniu keliu, raiška reikšmingai pakito švitinant ląsteles vienkartine ir frakcionuota JS (**2 pav. A**). Nustatyta, kad poveikis JS taip pat lėmė ir 34 genų, susijusių su ląstelės ciklo reguliavimu, reikšmingus raiškos pokyčius ląstelėse (**2 pav. B**). Klasterinės analizės duomenys taip pat atskleidė, kad iš viso 19 genų, susijusių su apoptoze, raiška pakito paveikus LLC1 ląsteles vienkartinės ir frakcionuotos dozės JS (**2 pav. C**). LLC1 ląstelėse po poveikio JS taip pat pakito 77 genų, dalyvaujančių imuniniame atsake, raiška (**2 pav. D**).

Visuminės miRNR raiškos pokyčių analizė. miRNR mikrogardelių rezultatai atskleidė, kad po poveikio JS LLC1 ląstelėse 18 unikalių miRNR raiška reikšmingai pakito (raiškos pokyčio lygis kartais > 2; p < 0.05). Iš jų dviejų miRNR (miR-34c-5p ir miR-145a-3p) raiška reikšmingai pakito LLC1 ląstelėse po poveikio skirtingo pobūdžio JS, tuo tarpu miR-34c-3p ir miR-3b-3p raiška padidėjo LLC1 ląstelėse tiek po apšvitos



2 pav. Klasterinės analizės rezultatai. Paveikslėlyje vizualizuoti genų raiškos pokyčių profiliai LLC1 ląstelėse po poveikio vienkartinės (2 ir 10 Gy) ir frakcionuotos (5x2 Gy) dozės JS: (A) p53 signalinio kelio; (B) ląstelės ciklo reguliavimo; (C) apoptozės ir (D) imuninio atsako.

Votogorijo	10 Gy		5x2 Gy		
Kategorija	miRNR	Genas-taikinys	miRNA	Genas-taikinys	
	mmu-miR-34c-5p↑	E2f3↓; E2f5↓; Ccne2↓	mmu-miR-30c-5p↑	Ccne2 \downarrow ; Stag1 \downarrow ; Orc4 \downarrow ; Skp2 \downarrow	
Ląstelės			mmu-miR-34c-5p↑	Ccne2↓; E2f3↓	
ciklas			mmu-miR-129-5p↑	Stag1↓; Orc4↓	
			mmu-miR-145a-5p↑	Orc4↓	
			mmu-miR-186-5p↑	Cdc27↓; Stag1↓	
	mmu-miR-34c-5p↑	Ccne2↓	mmu-miR-30c-5p↑	Ccne2↓	
- 52 hallos			mmu-miR-34c-5p↑	Ccne2↓	
p55 kenas			mmu-miR-129-5p↑	Pten↓	
			mmu-miR-145a-3p↓	Pmaip1↑; Sesn2↑	
Apoptozė			mmu-miR-30c-5p↑	Ppp3cb↓	
	mmu-miR-34b-3p↑	Spred1↓	mmu-miR-30c-5p↑	Lepr↓; Kras↓; Ppp3cb↓	
	mmu-miR-34c-3p↑	Spred1↓	mmu-miR-34c-3p↑	Gng5↓	
	mmu-miR-34c-5p↑	Pdk1↓	mmu-miR-34c-5p↑	Pdk1↓	
	mmu-miR-136-5p↓	Eda2r↑	mmu-miR-129-5p↑	Il6ra↓; Rock1↓	
Imuninis	mmu-miR-145a-3p↓	Cr2↑; Inpp5d↑	mmu-miR-186-5p↑	Vegfa↓; Pias2↓	
atsakas	mmu-miR-466a-5p↓	Eda2r↑; Egfr↑; Inhbb↑	mmu-miR-192-5p↑	Crk↓; Pias2↓	
	mmu-miR-710↓	Stat1↑; Pik3r3↑	mmu-miR-105↓	Tgfbr2↑; Stat1↑	
	· · · ·		mmu-miR-145a-3p↓	Tgfbr2↑; Cr2↑; Inpp5d↑; Ticam1↑	

2 lentelė. MiRNR genų-taikinių analizės rezultatai.

vienkartinės dozės 10 Gy, tiek po poveikio frakcionuotos dozės 5x2 Gy JS. Gauti rezultatai taip pat parodė, kad LLC1 ląstelėse po frakcionuotos dozės poveikio JS nustatytas didžiausias kiekis miRNR: miR-186-5p, miR-145a-5p, miR-129-5p, miR-192-5p, miR-129-2-3p, miR-30c-5p raiška reikšmingai padidėjo, o miR-105 – sumažėjo

miRNR taikinių analizė. Siekiant nustatyti miRNR, kurių raiška reikšmingai pakito po poveikio JS, funkcijas, naudojant *in silico* miRNR genų-taikinių analizę buvo nustatyti 6343 unikalūs genai-taikiniai, kurių raiška gali būti potencialiai reguliuojama šių miRNR. Tuomet buvo įvertinta korealiacija tarp visų genų, susijusių su ląstelės ciklo reguliavimu, p53 signalinio kelio, apoptozės ir imuninio atsako kategorijomis, ir miRNR, kurių raiška pakito LLC1 ląstelėse po poveikio vienkartine 10 Gy arba frakcionuota 5x2 Gy JS siekiant nustatyti potencialias miRNR-mRNR sąveikas minėtuose procesuose (**2 lentelė**).

Gauti rezultatai parodė, kad priešingos genų ir miRNR raiškos korealiacija buvo nustatyta tarp 8 miRNR ir 10 genų, kurių raiška pakito ląstelės ciklo, p53 signalinio kelio ir apoptozės kategorijose. miRNR genų-taikinių analizė taip pat atskleidė, kad 20 genų, kurių raiška pakito imuninio atsako kategorijoje, atvirkščiai korealiavo su 12 miRNR raiška.

Mikrogardelių rezultatų patvirtinimas. Siekiant įvertinti genų ir miRNR raiškos pokyčių rezultatus, gautus mikrogardelių pagalba, toliau kiekybinės PGR analizės metodu buvo įvertinta pasirinktų 4 genų ir miRNR raiška. Genų raiškos pokyčių rezultatai parodė, kad pasirinktų genų, dalyvaujančių p53 signaliniame kelyje, įskaitant Btg2, Ccng1, P21, raiška reikšmingai padidėjo LLC1 ląstelėse po poveikio JS, lyginant su nešvitintomis ląstelėmis. Taip pat buvo nustatyta, kad Thbs2 raiška reikšmingai padidėjo ląstelėse po poveikio frakcionuotos dozės 5x2 Gy JS. TL – PGR analizės rezultatai parodė, kad miR-34b-3p ir miR-34c-5p raiška reikšmingai padidėjo LLC1 ląstelėse po poveikio tiek vienkartinės 10 Gy tiek frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS. Gauti TL – PGR analizės rezultatai patvirtino genų ir miRNR raiškos pokyčių rezultatus, gautus mikrogardelių pagalba.



3 pav. Mikrogardelių rezultatų patvirtinimas TL – PGR metodu. TL – PGR rezultatų analizė pagrįsta 2⁻ $\Delta\Delta$ Ct metodu ir normalizuota Gpdh ir snoRNA-135 "namų ruošos genais" atitinkamai genų ir miRNR raiškos tyrimui. Grafikai rodo genų raiškos pokyčius kartais. A – genų (Btg2, Ccng1, P21 ir Thbs2) ir B – miRNR (miR-34b-3p, miR-34c-5p, miR186-5p ir miR-145a-5p) LLC1 ląstelėse *in vitro* ir LLC navikuose po poveikio vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS. Brūkšniai ± SN (n = 3; t – testas; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001; ****p ≤ 0,001).

Taip pat buvo įvertinti pasirinktų genų ir miRNR raiškos pokyčiai LLC1 navikuose *in vivo* ląstelėse po poveikio vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS (**3 pav.**). Kiekybinės PGR analizės rezultatai atskleidė, kad Btg2, Ccng1 ir P21 genų raiška padidėjo LLC1 navikuose po poveikio vienkartinės 10 Gy dozės JS. Tačiau, nors Thbs2 raiška padidėjo *in vivo* po vienkartinės 10 Gy dozės JS poveikio, reikšmingas Thbs2 raiškos pokytis LLC1 ląstelėse *in vitro* buvo nustatytas tik po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS. TL – PGR analizės rezultatai taip pat parodė, kad poveikis frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS nesukėlė reikšmingų pasirinktų genų ir miRNR raiškos pokyčių LLC1 navikuose *in vivo* (**3 pav.**).

Apibendrinant, mūsų gauti rezultatai parodė, kad genų ir miRNR raiška LLC1 ląstelėse po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote priklauso nuo poveikio JS tipo. Genų praturtinimo analizė parodė, kad dauguma genų, kurių raiška kito po poveikio frakcionuotos dozės JS, priklauso P53, ląstelės ciklo, apoptozės, imuninio atsako funkcinėms kategorijoms. Be to, miRNR taikinių analizė parodė reikšmingą raiškos koreliaciją tarp genų ir miRNR, kurių raiška keitėsi po poveikio JS. Nepaisant to, jog frakcionuotos dozės JS indukuojamas LLC1 navikų atsakas gali priklausyti nuo naviko mikroaplikos, gauti rezultatai parodė, jog pagrindiniai signaliniai keliai, indukuojami pelių vėžinėse ląstelėse atsako į JS metu, priklauso nuo poveikio JS. Šio darbo metu gauti rezultatai gali būti pritaikomi tolesnių tyrimų metu, aiškinantis atsparumo radioterapijai vystymosi priežastis naudojant gyvūnų modelius.

2. Transkriptominiai pelės ir žmogaus vėžinių ląstelių profiliai, ląsteles auginant tarpląsteliniu užpildu praturtintoje mikroaplinkoje

Norėdami įvertinti, kokia yra tarpląstelinio užpildo įtaka ląstelėse vykstantiems biologiniams procesams, šiame darbo etape lyginome visuminius genų ir miRNR raiškos pokyčius LLC1 ląstelėse, 48 val. kultivuotose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, su genų ir miRNR raiškos lygiais LLC1 ląstelėse, augintose monosluoksnį (2D) formuojančioje ląstelių kultūroje. Taip pat nustatėme genų raiškos pokyčius žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelėse, kultivuotose minėtomis sąlygomis.

Morfologijos pokyčiai vėžines ląsteles auginant 3D kultūroje. Žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelės DLD1 ir HT29 ir pelės Lewis'o plaučių karcinomos ląstelės buvo kultivuojamos tarpląstelinio užpildo baltymais praturtintoje mikroaplinkoje ir įvertinti morfologiniai ląstelių pokyčiai (4 pav. A). Praėjus 48 val. nuo užsėjimo, vėžinės ląstelės įgijo charakteringą morfologiją 3D kultūroje. Be to, siekiant geriau įvertinti ląstelių morfologinius pokyčius buvo atlikta konfokalinė mikroskopija ląstelių aktino citoskeletą pažymint faloidinu (4 pav. B). Ląstelių nuotraukos parodė, kad 3D modelinėje sistemoje kultivuotos vėžinės ląstelės patyrė citoskeleto persitvakymą ir neteko aktino streso gijų.



4 pav. 2D (viršutinė eilutė) bei Ir-ECM 3D (apatinė eilutė) modelinėse sistemose kultivuotų DLD1 ir HT29 ląstelių morfologija praėjus 48 val. nuo užsėjimo. Morfologiniai DLD1 ir HT29 ląstelių pokyčiai 2D ir Ir-ECM 3D kultūrose įvertinti invertuotu optiniu bei fluorescenciniu konfokaliniu (nuotraukų mastelis 50 μm) mikroskopais. F-aktinas dažytas su AlexaFluor 633 žymėtu faloidinu (raudona), branduoliai dažyti DAPI dažu (mėlyna).

Genų ir miRNR raiškos pokyčiai LLC1 ląstelėse, augintose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D kultūroje. Gauti genų raiškos pokyčių analizės rezultatai parodė, kad LLC-1 ląstelėse, 48 val. kultivuotose lr-ECM 3D ląstelių kultūroje, reikšmingai pakito 1884 genų raiška (raiškos pokyčio lygis >1,5 karto, p <0,05), iš kurių 832 genų raiška padidėjo, o 1052 – sumažėjo, lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D (3 Lentelė). Gauti miRNR raiškos pokyčių rezultatai atskleidė, kad ląstelėse, 48 val. kultivuotose lr-ECM 3D kultūroje, reikšmingai pakito 77 miRNR raiška (> 2 raiškos pokytis kartais, p < 0.05), iš kurių 41 miRNR raiška padidėjo ir 36 – sumažėjo, lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D. Taip pat nustatėme, kad 16 miRNR, kurių raiška padidėjo ląstelėse, kultivuotose lr-ECM 3D, priklauso 3 miRNR klasteriais, lokalizuotiems 2 (miR-466 miR-466~467~669 klasteris), 9 (miR-34 klasteris) ir 12 (miR-376 klasteris) chromosomose, kai tuo tarpu 10 miRNR, priklausančių 3 miRNR klasteriams, lokalizuotiems 2, 12 ir X chromosomose, raiška sumažėjo. Apie 30% miRNR, kurių raiška mažėjo, yra lokalizuotos X chromosomoje.

3 lentelė. Kiekybiniai genų ir miRNR raiškos pokyčiai LLC1 ląstelėse, augintose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D kultūroje

	Visi, kurių raiška kito	Visi, kurių raiška padidėjo	Visi, kurių raiška sumažėjo
Genai	1884	832	1052
miRNAs	77	41	36

Genų ir miRNA raiškos pokyčio lygis kartais > 1.5 ir 2, atitinkamai, p<0.05.

KEGG signalinių kelių praturtinimo analizė. Tolimesniuose gautų duomenų analizės etapuose siekėme išsiaiškinti, kuriems signaliniams keliams priklausančių genų raiška keitėsi LLC-1 ląstelėse, kultivuotose 3D sąlygomis. KEGG analizė nustatė 73 funkcines genų grupes, statistiškai reikšmingai praturtintas bent 5 genais, kurių raiška statistiškai reikšmingai keitėsi ląstelėse, kultivuotose lr-ECM 3D sąlygomis, lyginant su 2D. Tolesnė gautų duomenų analizė atskleidė bei apjungė į 3 didesnes funkcines grupes – MAP kinazių; ląstelės adhezijos ir imuninio atsako – susijusias su naviko vystymusi ir progresavimu (**4 lentelė**). Nustatėme, kad statistiškai reikšmingai pakito 25 genų, priklausančių MAPK kinazių signaliniam keliui, raiška (p = 6,23e-08) LLC1 ląstelėse, kultivuotose lr-ECM 3D. Taip pat keitėsi 48 ląstelių adhezijos grupei priskirtų genų raiška. Statistiškai reikšmingai keitėsi aktino citoskeleto reguliacijoje (p = 1.35e-06) ir glaudžiųjų jungčių sudaryme (p = 3.33e-05) dalyvaujančių genų raiška. Be to, nustatėme 36 genų, dalyvaujančių imuniniame atsake, raiškos pokyčius. Šiai grupei priskiriami genai, susiję su citokinų – citokinų receptorių, chemokinų, T ir B ląstelių receptorių sinteze bei Jak – STAT signaliniu keliu (**3 Lentelė**).

miRNR taikinių analizė. Norint įvertinti, kokie biologiniai procesai gali būti reguliuojami miRNR, kurių raiška keitėsi LLC1 ląstelėse, kultivuotose Ir-ECM 3D ląstelių kultūroje, atlikome miRNR taikinių analizę *in silico*. Identifikavome 8630 unikalius genus-taikinius, kuriuos potencialiai reguliuoja šios miRNR. Atlikta duomenų funkcinė praturtinimo analizė atskleidė, kad nustatyti miRNR genai-taikiniai priklauso 69 skirtingoms funkcinėms grupėms. Be to, praturtinimo analizė parodė, kad MAPK signalinio kelio, ląstelių adhezijos ir imuninio atsako funkcinės grupės buvo vienos reikšmingiausiai praturtintų genais-taikiniais grupių.

Votogorijo	Visi genai, kurių raiška kito		Genai, kurių raiška padidėjo		Genai, kurių raiška sumažėjo	
Kategorija	Genai	p reikšmė	Genai	p reikšmė	Genai	p reikšmė
MAP Kinazės						
MAPK signalinis kelias	25	6.23e-08	11	0.0010	14	0.0002
Ląstelių adhezija						
Aktino citoskeleto reguliacija	20	1.35e-06	6	0.0404	14	3.76e-05
Sutelktinių sąlyčių lasteliu jungtys	17	3.33e-05	7	0.0148	10	0.0018
Ląstelių adhezijos molekulės (CAM)	10	0.0062	5	0.0368	5	NS
Sąlyčio jungtys	7	0.0103	2	NS	5	0.0174
Glaudžiosios jungtys	9	0.0103	5	NS	4	NS
Tarpląstelinio užpildo ir receptorių sąveika	6	0.0237	4	0.0257	2	NS
Imuninis atsakas						
Citokinų-citokinų receptorių sąveika	18	0.0001	6	NS	12	0.0011
T ląstelių receptorių signalinis kelias	11	0.0003	3	NS	8	0.0011
VEGF signalinis kelias	9	0.0004	5	0.0062	4	NS
DNR-atpažinimo kelias	7	0.0013	4	0.0111	3	NS
signalinis kelias	7	0.0058	3	NS	4	NS
Į RIG-I panašių receptorių signalinis kelias	6	0.0121	5	0.0045	1	NS
NK ląstelių valdomas citotoksiškumas	8	0.0153	3	NS	5	0.0435
Jak-STAT signalinis kelias	9	0.0159	3	NS	6	0.0336
Fc epsilon RI signalinis kelias	6	0.0186	2	NS	4	NS
Chemokinų signalinis kelias	9	0.0362	3	NS	6	NS
Į toll panašių receptorių signalinis kelias	5	0.0401	4	NS	2	NS

4 lentelė. KEGG funkcinės praturtinimo signaliniais keliais analizės rezultatai

Genų, kurių raiška kito LLC1 ląstelėse, augintose 3D modelinėje sistemoje funkcinės kategorijos. Reikšmingai prasiturtinusios kategorijos laikytos tos, kurios prasiturtino bent 5 genais, p<0.05

Paskutiniame duomenų analizės etape buvo įvertintas ryšys tarp miRNR ir genų, dalyvaujančių MAPK, ląstelių adhezijos ir imuninio atsako keliuose, kurių raiška keitėsi LLC1 ląstelėse jas kultivuojant 3D kultūroje. (**5 lentelė**). Nustatyta priešingos raiškos koreliacija tarp 11 miRNR ir 7 genų, priklausančių MAPK signaliniam raiškos keliui. Be to, 14 genų taikinių, kurie yra susiję su ląstelės adhezija, raiškos

Kategorija Genai		miRNA		
	Cacna1d ↑	miR-137-3p↓; miR-448-3p↓; miR-495- 3p↓		
	Ikbkg 个	miR-137-3p↓		
	Traf6↑	miR-590-3p↓		
MAP kinazių signalinis kalias	Kras↓	miR-761↑		
signamis Kenas	Mknk1↓	miR-195-5p↑		
	Pak2↓	miR-297a-3p↑		
	Sos2↓	miR-34b-3p个, miR-34c-3p个, miR- 466f-3p个, miR-500-3p个		
	Arhgef4↑	miR-135a-5p \downarrow , miR-448-3p \downarrow , miR- 200b-3p \downarrow , miR-20b-3p \downarrow		
	Col1a1↑	miR-135a-5p↓, miR-137↓, miR-590↓		
	Itpr1↑	miR-544-3p↓		
	Pard3↑	miR-495-3p↓		
	Slc9a1↑	miR-9-5p↓		
	Vegfa ↑	miR-1a↓		
Ląstelės	Tmsb4x↓	miR-448个		
adhezija	Flna↓	miR-328-3p miR-761↑		
	Gnas↓	miR-877-3p↑		
	Htr2c↓	miR-466d-3p↑		
	Pak2↓	miR-297a-3p↑		
	Pak3↓	miR-297a-3p↑		
	Rhoa↓	miR-466f-3p↑		
	$Ssh1 \downarrow$	miR-467b↑		
	Pard3↑	miR-495-3p↓		
	Eif2ak1↓	miR-500-3p↑		
Imuninis atsakas	Oas3↓	miR-297a-3p个, miR-466b-3p个, miR- 466d-3p个, miR-466f-3p个, miR- 466g个, miR-467d-3p个, miR-467e-3p个		
	Ppp2r1b↓	miR-195-5p↑, miR-672-5p↑		
	Ppp2r2b↓	miR-466g个		
	Xcr1↓	miR-669b↑		

5 lentelė. miRNR taikinių analizės rezultatai.

Genų ir miRNR, kurių raiška didėjo ląstelėse, kultivuotose 3D, pavaidinimai yra paryškinti

pokytis atvirkščiai korealiavo su 18 miRNR, o 6 genų, dalyvaujančių imuniniame atsake, raiškos pokytis atvirkščiai korealiavo su 14 miRNR.

Genų raiškos pokyčiai DLD1 ir HT29 ląstelėse, augintose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D kultūroje. Mikrogardelių duomenų analizė parodė, kad DLD1 ir HT29 ląstelėse, 48 val. kultivuotose tarpląstelinio užpildo komponentais praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, reikšmingai skyrėsi atitinkamai 841 ir 1190 genų raiška (raiškos pokyčio lygis kartais > 1,5, p < 0,05), lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D (5 pav.). Didesnės dalies genų raiška mažėjo ląstelėse, kultivuotose 3D (DLD1 ląstelėse 637 ir HT29 – 804). Venn'o diagramų analizė parodė, kad iš viso 383 genų raiška kito tiek



5 pav. Venn'o diagramos. Statistiškai reikšmingai (p <0,05, raiškos skirtumas \geq 1,5 kartus) pakitusios raiškos genų skaičius DLD1 ir HT29 ląstelėse praėjus 48 val. nuo užsėjimo 2D ir Ir-ECM 3D modelinėse sistemose.

DLD1, tiek HT29 ląstelėse. Iš jų tik 37 iš 383 bendrai pakitusių genų raiška didėjo, o 346 – mažėjo.

Signalinių kelių praturtinimo analizė. KEGG signalinių kelių praturtinimo analizės rezultatai atskleidė, kad DLD1 ir HT29 ląstelėse reikšmingai kito genų, priskiriamų atitinkamai 45 ir 35 funkcinėms kategorijoms. 6 lentelėje parodyta 13 bendrų funkcinių kategorijų, reikšmingai praturintų genais, kurių raiška kito DLD1 ir HT29 ląstelėse. Didžiausias genų kiekis nustatytas "Metabolinių kelių" kategorijoje (DLD1 ląstelėse 44, HT9 – 48). Vis dėlto reikšmingiausi pokyčiai nustatyti su "ląstelė – ląstelė" ir "ląstelė – tarpląstelinis užpildas" sąveikomis susijusiose genų kategorijose: sutelktinės sąveikos (DLD1: p = 7,47 · 10⁻⁶; HT29: p = 1.59 · 10⁻⁵); adhezinių jungčių

Kategorija	1	ULUI	1	147
	Genai	p reikšmė	Genai	p reikšmė
Sutelktinių sąlyčių ląstelių jungtys	17	7.47e-06	19	1.59e-05
MAPK signalinis kelias	13	0.0056	25	9.90E-07
Su vėžiu susijæ signaliniai keliai	17	0.0005	25	1.59E-05
Metaboliniai keliai	44	1.95e-05	48	0.0012
Sąlyčio jungtys	9	0.0001	10	0.0002
p53 signalinis kelias	8	0.0003	7	0.0092
Glaudžiosios jungtys	11	0.0003	10	0.0092
ECM-receptorių sąveika	9	0.0003	7	0.0207
Aktino citoskeleto reguliacija	14	0.0003	18	0.0001
Endocitozė	13	0.0005	17	0.0002
Chemokinų signalinis kelias	11	0.0034	11	0.0247
Citokinų-citokinų receptorių sąveika	12	0.0115	14	0.0207
Wnt signalinis kelias	7	0.0387	9	0.0394
Funkcinės grupės, prasiturtinusios bent 5 genais, p<0	.05			

6 lentelė. KEGG funkcinės praturtinimo signaliniais keliais analizės rezultatai Vatagorija DI D1 HT29

(DLD1: p = 0.0001; HT29: p = 0.0002); glaudžiųjų jungčių (DLD1: p = 0.0003; HT29: p = 0.0092); tarpląstelinio užpildo ir receptorių sąveikos (DLD1: p = 0,0003; HT29: p = 0,0207) bei aktino citoskeleto reguliavimo (DLD1: p = 0,0003; HT29: p = 0,0001). Akivaizdūs pokyčiai pastebėti MAPK signalinio kelio kategorijoje (p = 0.0056 ir p = 9.9 \cdot 10⁻⁷, atitinkamai). Verta paminėti, kad reikšmingai skyrėsi ir genų, susijusių su uždegiminiais procesais, kategorijos — chemokinų signalinio kelio (DLD1: p = 0,0034; HT29: p = 0,0247) bei citokinų-citokinų receptorių sąveikos (DLD1: p = 0,0115; HT29: p = 0,0207).

Klasterinė analizė. KEGG analizės pagalba identifikuotų reikšmingiausiai pakitusių funkcinių kategorijų (ląstelių adhezijos, MAPK ir imuninio atsako) individualių genų raiškos pokyčiai atvaizduoti **6 paveiksle**.



6 pav. Klasterinės analizės rezultatai. Paveiksle vizualizuoti genų raiškos pokyčių profiliai DLD1 ir HT29 ląstelėse po vienkartinės (2 arba 10 Gy) ir frakcionuotos (5x2 Gy) dozės poveikio JS: (A) ląstelės adhezijos; (B) MAPK; (C) imuninio atsako.

Ląstelių adhezijos kategorijoje (**6A pav.**) pavaizduoti 59 genų, dalyvaujančių sutelktinio sąlyčio, adhezijos ir glaudžiųjų jungčių formavime bei ECM-receptorių ir aktino ląstelės griaučių reguliavime, raiškos skirtumai. Nors kai kurie pavieniai šios kategorijos genai neviršijo slenkstinės ribos (> 1,5 pokytis kartais, p < 0,05), tačiau daugumos jų raiška 3D kultivuotose DLD1 ir HT29 buvo mažesnė nei 2D. MAPK signaliniame kelyje genų grupė pavaizduota **6B pav.** Šioje grupėje iš viso 32 genų raiška kito DLD1 ir HT29 ląstelėse, kultivuotose 3D ląstelių kultūroje. **6C pav.** Pavaizduoti 28 genų, dalyvaujančių imuninio atsako kelyje, pokyčiai.

Mikrogardelių rezultatų patvirtinimas. TL-PGR metodu nustatėmė reikšmingai didesnius Hnf4a, Ifb1, klf8 ir Fgfr4 genų raiškos pokyčius LLC-1 ląstelėse, kultivuotose lr-ECM 3D, lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D (7 pav. A ir B, juodi stulpeliai). Nustatyta, kad miR-207, miR-376c, miR-466f ir miR-195a raiškos pokytis taip pat reikšmingai didėjo LLC-1 ląstelėse, kultivuotose Ir-ECM 3D. TL – PGR analizės rezultatai taip pat parodė, kad visų pasirinktų genų ir miRNR raiška buvo didesnė LLC1 navikuose *in vivo*, lyginant su ląstelėmis, kultivuotomis 2D (7 pav. A ir B, pilki stulpeliai).



7 pav. Mikrogardelių metodu gautų rezultatų patvirtinimas TL-PGR. Grafikuose vaizduojami A) genų (hnf4a, infb1, klf8, fgfr4) raiškos pokyčiai; B) miRNR (miR-207, miR-376c-3p, miR-466f-3p ir miR-195a-5p) raiškos pokyčiai LLC1 ląstelėse, augintose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje bei pelių LLC1 navikuose, palyginus su raiškos lygiais ląstelėse, kultivuotose 2D; C) Pasirinktų genų (MYB, ID1 ir ID3) raiškos pokyčiai DLD1 ląstelėse; D) pasirinktų genų (MYB, CDKN1C ir ID2) raiškos pokyčiai HT29 ląstelėse, kultivuotose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, palyginus su raiškos lygiais ląstelėse, kultivuotose 2D; C) Pasirinktų genų (MYB, ID1 ir ID3) raiškos pokyčiai DLD1 ląstelėse; D) pasirinktų genų (MYB, CDKN1C ir ID2) raiškos pokyčiai HT29 ląstelėse, kultivuotose 2D. TL-PGR metodu gauti rezultatai analizuoti naudojant $\Delta\Delta$ Ct metodą. Gapdh ir snoRNR-135 raiškos lygiai buvo naudoti TL-PGR metodu gautų raiškos pokyčių rezultatų LLC1 ląstelėse normalizavimui. HPRT raiškos lygiai buvo naudojami raiškos pokyčių rezultatų, gautų DLD1 ir HT29 ląstelėse normalizavimui. Rezultatuose rodomas vidurkis ± SN (n=3).

Didesnė 3D nei 2D kultūroje augintose LLC1 ląstelėse TL–PGR analizei pasirinktų genų ir miRNR raiška buvo nustatyta taip pat ir mikrogardelių metodu, taigi TL–PGR analizė patvirtino mikrogardelių duomenis.

TL–PGR rezultatų analizė taip pat patvirtino ID1, ID2, ID3, CDKN1C ir transkripcijos aktyvatoriaus MYB genų raiškos pokyčių rezultatus, gautus mikrogardelių pagalba DLD1 ir HT29 ląstelėse, kultivuotose tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje (**7 pav. C ir D**).

Apibendrinant, gauti signalinių kelių praturtinimo analizės rezultatai parodė, kad MAP kinazių, ląstelių adhezijos ir imuninio atsako funkcinės kategorijos reikšmingai praturtinamos genais, kurių raiška kito LLC1, DLD1 ir HT29 ląstelėse, jas perkėlus iš 2D į 3D modelinę sistemą. Visuminė miRNR raiškos analizė parodė, kad dauguma miRNR, kurių raiška keitėsi, vėžinėse ląstelėse dalyvauja nuo ECM priklausomoje reguliacijoje. Lyginant genų ir miRNR raiškos pokyčius LLC1 ląstelėse, augintose 3D modelinėje sistemoje su LLC1 navikais pelėse, pastebėtas panašumas tarp dviejų modelinių sistemų. Be to, gauti rezultatai, rodantys, kad MAPK, ląstelių adhezijos ir imuninio atsako signaliniai keliai panašiai reguliuojami tiek 3D modelinėje sistemoje, tiek navikuose *in vivo*, rodo plačias 3D modelinių sistemų pritaikymo galimybes transkripciniuose vėžio tyrimuose.

3. Genų raiškos pokyčiai žmogaus gaubtinės žarnos DLD1 ir HT29 ląstelėse po poveikio JS, ląsteles kultivuojant tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje

Siekiant ištirti ląstelių atsaką į JS, ląsteles kultivuojant tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, buvo įvertinti genų raiškos pokyčiai DLD1 ir HT29 ląstelėse praėjus 4 val. po poveikio vienkartinės (2 Gy ir 10 Gy) arba frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS, lyginant su genų raiškos lygiais nešvitintose ląstelėse.

DLD1 ir HT29 lastelių gyvybingumo pokyčiai po poveikio JS, lasteles kultivuojant 2D ir tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje. Po poveikio vienkartinės dozės JS gauti rezultatai rodo, kad, palyginus su kontrolinėmis lastelėmis, abiejų lastelių linijų gyvybingumas reikšmingai mažėja didinant JS dozę (8 pav. A). Tačiau ląsteles kultivuojant tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje, DLD1 ir HT29 lastelių gyvybingumas yra didesnis nei 2D. DLD1 lastelių atveju po poveikio vienkartinės 10 Gy dozės JS, lasteles kultivuojant 2D, gyvybingumas sumažėjo iki $0.3\% \pm 0.4\%$, o 3D – iki $6.8\% \pm 2.3\%$, o <u>HT29 lastelių atveju</u> 2D – iki $0,11\% \pm 0,1\%$; 3D – iki 16,9% \pm 3,5%, atitinkamai. Taip pat buvo ivertinti ląstelių gyvybingumo pokyčiai po poveikio frakcionuotos dozės JS. Gauti rezultatai (8 pav. B) parodė, kad lastelių gyvybingumas buvo reikšmingai didesnis po poveikio frakcionuotos dozės JS, lyginant su atitinkamais gyvybingumo pokyčiais po poveikio vienkartinės dozės JS. Taip pat klonogeninės analizės rezultatai parodė, kad lastelių gyvybingumas po poveikio frakcionuotos dozės JS buvo didesnis lasteles kultivuojant tarplasteliniu užpildu praturtintoje 3D lastelių kultūroje, lyginant su 2D. DLD1 lastelių atveju po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS ląsteles kultivuojant 2D, gyvybingumas sumažėjo iki $5.5\% \pm 0.7\%$, o 3D - iki 29.1% $\pm 2.6\%$, o tuo tarpu HT29 lasteliu atveju 2D - iki 19.8% $\pm 4,7\%$, 3D – iki 56% $\pm 4,2\%$.



8 pav. Žmogaus gaubtinės žarnos vėžinių linijų DLD1 ir HT29 ląstelių, augintų 2D ir 3D modelinėse sistemose gyvybingumo priklausomybė nuo vienkartinės dozės JS poveikio frakcijos dydžio (A) ir frakcionuotos dozės JS poveikio frakcijų skaičiaus (B). Brūkšniai ± SN (n=3; t-testas; *P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001).

Genų raiškos pokyčiai DLD ir HT29 ląstelėse po poveikio JS, ląsteles kultivuojant tarpląsteliniu užpildu praturtintoje 3D ląstelių kultūroje. Gauti genų raiškos pokyčių rezultatai parodė, kad DLD1 ir HT29 ląstelių atsakas į JS priklauso nuo apšvitos JS tipo. Bendrai po poveikio vienkartinės 2 Gy ir 10 Gy bei frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS DLD1 ląstelėse reikšmingai pakito 1573, o HT-29 – 935 genų raiška (pokytis kartais > 1,5; P < 0,05), lyginant su genų raiškos lygiais nešvitintuose ląstelėse. DLD1 ląstelėse po vienkartinės dozės 2 Gy ir 10 Gy poveikio JS statistiškai reikšmingai pakito atitinkamai 468 (114 padidėjo, o 354 sumažėjo) ir 953 (275 padidėjo, 678 sumažėjo) genų raiška. Tuo tarpu po frakcionuotos 5x2 Gy dozės poveikio JS statistiškai reikšmingai pakito 778 genų raiška: iš jų 302 padidėjo, o 478 sumažėjo. <u>HT29 ląstelėse</u> po poveikio vienkartinės 2 Gy ir 10 Gy dozės JS statistiškai reikšmingai pakito atitinkamai 382 (iš jų 104 padidėjo, o 278 sumažėjo) ir 579 (136 padidėjo, 443 sumažėjo) genų raiška. Tuo tarpu po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS statistiškai reikšmingai pakito 352 genų raiška. Tuo tarpu po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS statistiškai reikšmingai pakito atitinkamai 382 (iš jų 104 padidėjo, o 278 sumažėjo) ir 579 (136 padidėjo, 443 sumažėjo) genų raiška. Tuo tarpu po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS statistiškai reikšmingai pakito 352 genų raiška: iš jų 111 genų raiška padidėjo, o 241 – sumažėjo.

	Poveikis JS	Genų skaičius	Genai, kurių raiška didėjo	Genai, kurių raiška mažėjo
	2 Gy	468	114	354
DLD1	10 Gy	953	275	678
	5x2 Gy	778	302	476
	2 Gy	382	104	278
HT29	10 Gy	579	136	443
	5x2 Gy	352	111	241

7	lontolò	Kielzyhines	gonu r	aičkas	nobyčiu	analizás	razultatai
'	iunuu.	KICKyDIIICS	gunų i	aiskus	pokycių	ananzus	i czuitatai.

Genų raiškos pokyčio lygis didesnis nei 1.5, P<0.05.

KEGG praturtinimo signaliniais keliais analizė. KEGG analizė parodė, kad po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS DLD1 ląstelėse reikšmingiausiai buvo praturtinti ląstelės ciklo reguliacijos ($P = 2.33 \times 10^{-10}$), DNR replikacijos ($P = 1.84 \times 10^{-9}$) ir P53 ($P = 5.37 \times 10^{-8}$) signaliniai keliai. DNR reparacijos signaliniai keliai buvo antra pagal reikšmingumą grupė kategorijų, reikšmingai praturtintų genais DLD1 ląstelėse po poveikio 5x2 Gy JS. Tačiau, kitaip nei DLD1 ląstelėse, HT29 ląstelėse po poveikio 5x2 Gy JS labiausiai praturtintos kategorijos buvo genai, dalyvaujantys imuninio atsako signaliniuose keliuose.

Klasterinė analizė. Genų, dalyvaujančių p53, ląstelės ciklo, DNR reparcijos ir imuninio atsako signaliniuose keliuose, pokyčiai DLD1 ir HT29 ląstelėse po vienkartinės 10 Gy ir frakcionuotos 5x2 Gy dozės poveikio JS vizualizuoti **9 pav**. Gauti klasterinės analizės rezultatai parodė, kad daugumos genų, dalyvaujančių ląstelės ciklo reguliavime, DNR pažaidų taisyme ir p53 signaliniame kelyje, raiška labiausiai padidėjo po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS (**9 pav**. A-C).

Didžiausią tirtų genų kategoriją sudaro genai, dalyvaujantys imuniniame ląstelės atsake (**9 pav. 3D**). Šią kategoriją galime išskirti į 3 subkategorijas. Pirmąją subkategoriją sudaro genai, kurių raiška reikšmingai padidėjo tik HT-29 ląstelėse po poveikio



9 pav. Klasterinės analizės rezultatai DLD1 ir HT29 ląstelėse rodo funkcines ląstelės ciklo (A), DNR pažaidų taisymo (B), P53 (C), imuninio atsako (D) ir histonų (E) kategorijas, kurioms priklausančių genų raiška keitėsi po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote DLD1 ir HT29 ląstelėse, kultivuotose 3D modelinėje sistemoje, lyginant su nešvitintomis ląstelėmis. Ląstelės buvo veikiamos vienkartinės 2 Gy (1 ir 4 stulpeliai) ir 10 Gy (2 ir 5 stulpeliai) bei frakcionuotos 5x2 Gy (3 ir 5 stulpeliai) dozės JS. Raudona spalva žymi genų raiškos padidėjimą, mėlyna – sumažėjimą.

frakcionuotos dozės JS. Antrą subkategoriją sudaro genai, kurių raiška padidėjo abiejų linijų ląstelėse po poveikio vienkartinės ir frakcionuotos dozės JS, tačiau didžiausi genų raiškos pokyčiai nustatyti HT29 ląstelėse po frakcionuotos dozės švitinimo. Trečiąjį pogrupį sudaro genai, kurių raiška mažėjo DLD1 ir HT29 ląstelėse tiek po poveikio vienkartinės dozės (2 Gy ir 10 Gy) JS, tiek po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS, tačiau didžiausias genų raiškos sumažėjimas pastebėtas ląstelėse po vienkartinės 10 Gy dozės JS poveikio.



10 pav. Mikrogardelių metodu gautų rezultatų patvirtinimas TL-PGR. Grafikuose vaizduojami A) DLD1 ląstelių genų (CDK1, RAD51, THBS1, PCNA) ir HT-29 ląstelių genų (IL-29, IFITM1, IFIT1, OAS2) raiškos pokyčiai, nustatyti mikrogardelių arba TL-PGR metodais. B) Genų raiškos pokyčiai po poveikio frakcionuotos dozės jonizuojančiąja spinduliuote DLD1 ir HT29 ląstelėse, augintose 2D ir 3D modelinėse sistemose, lyginant su nešvitintomis ląstelėmis. Rezultatuose rodomas vidurkis \pm SN (n=3; t-testas; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,001).

DLD1 ir HT29 ląstelėse tai pat nustatyta sumažėjusi histonų ar histonų formavimąsi reguliuojančių genų raiška po poveikio JS (**9 Pav. E**). Tačiau didžiausias genų raiškos sumažėjimas nustatytas ląstelėse po poveikio vienkartinės 10 Gy dozės JS.

Mikrogardelių rezultatų patvirtinimas. Genų raiškos pokyčių tyrimui TL-PGR DLD-1 ląstelėse po poveikio JS buvo pasirinkti 4 genai, dalyvaujantys ląstelės ciklo reguliavime, DNR pažaidų taisyme ir p53 signaliniame kelyje (CDK1, RAD51, THBS1 ir PCNA), ir 4 genai, dalyvaujantys imuninio atsako kelyje (IL29, IFITM1, IFIT1 ir OAS2), kurių raiškos pokyčiai buvo nustatyti mikrogardelių pagalba.

TL-PGR analizės rezultatai parodė, kad genų (CDK1, RAD51, THBS1 ir PCNA) raiška reikšmingai kinta DLD1 ląstelėse, kultivuotose 3D, po poveikio 5x2 Gy JS, lyginant su nešvitintomis ląstelėmis, o tuo tarpu tomis pačiomis sąlygomis palygintose HT29 ląstelėse po poveikio frakcionuotos dozės JS nustatyta statistiškai reikšmingai didesnė IL-29; IFITM1; IFIT1 ir OAS2 genų raiška (**10 pav. A**).

Taip pat palyginome genų raiškos profilius ląstelėse, kultivuotose 2D ir 3D modelinėse sistemose po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS (**10 pav. B**). DLD1 ląstelėse, kultivuotose 3D modelinėje sistemoje nustatyti statistiškai reikšmingai didesni CDK1, RAD51, THBS1 ir PCNA genų raiškos pokyčiai, atitinkamai, lyginant su švitintomis ląstelėmis, kultivuotomis 2D. Tuo tarpu HT29 ląstelėse, kultivuotose 3D po poveikio frakcionuotos 5x2 Gy dozės JS, nustatyti statistiškai reikšmingai didesni IFIT1 ir OAS2 genų raiškos pokyčiai, lyginant su švitintomis ląstelėmis, augintomis 2D.

Apibendrinant, vienkartinės ir frakcionuotos dozės poveikis jonizuojančiąja spinduliuote lėmė skirtingus visuminės genų raiškos profilius gaubtinės žarnos vėžinių

linijų DLD1 ir HT29 lastelėse, augintose 3D salygomis. Nepaisant to, kad po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote didžiosios dalies genų raiška mažėjo abejų linijų lastelėse, ląstelės ciklo, DNR pažaidų taisymo ir imuninio atsako funkcinėms kategorijoms priklausančių genų raiška daugiausiai didėjo lastelėse, kultivuotose 3D modelinėje sistemoje po poveikio JS. Nustatyta, kad pasirinktų genų raiška po poveikio FD jonizuojančiaja spinduliuote priklauso ir nuo ląstelių kultivavimo sąlygų – didesnis genų raiškos pokytis nustatytas ląstelėse, kultivuotose 3D modelinėje sistemoje. Be to, mes parodėme, kad abiejų linijų ląstelės, kultivuotos 3D modelėje sistemoje, yra atsparesnės jonizuojančios spinduliuotės poveikiui, lyginant su lastelėmis, kultivuotomis 2D. Šie rezultatai rodo, kad vėžinių lastelių išgyvenimas po poveikio JS be P53 statuso priklauso ir nuo tarpląstelinio užpildo JS paveiktų ląstelių mikroaplinkoje. Mūsų gauti rezultatai taip pat leidžia teigti, kad tarplasteliniu užpildu praturtinta 3D lastelių kultūra, kombinuojant su poveikiu frakcionuotos dozės JS, būtų galima naudoti norint geriau suprasti molekulinius mechanizmus, susijusius su atsparumo spindulinei terapijai išsivystymu navikuose. Taigi, platesnis 3D lastelių kultūrų ir FD poveikio JS naudojimas radiobiologijos tyrimuose atvers naujas spindulinės terapijos taikymo galimybių plėtros kryptis.

IŠVADOS

- 1. Visuminis genų ir miRNR raiškos profilis pelės plaučių karcinomos LLC1 ląstelėse po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio priklauso nuo apšvitos tipo, tačiau genų ir miRNR raiškos pokyčių tendencijos po poveikio frakcionuotos dozės JS LLC1 ląstelėse *in vitro* ir LLC1 pelių navikuose nesutampa.
- 2. Genų ir miRNR raiška LLC1 ląstelėse, taip pat genų raiška žmogaus gaubtinės žarnos DLD1 ir HT29 ląstelėse priklauso nuo tarpląstelinio užpildo.
- **3.** Genų, dalyvaujančių MAP kinazių, ląstelių adhezijos ir imuninio atsako signaliniuose keliuose, raiška tiek pelės (LLC1), tiek žmogaus (DLD1 ir HT29) ląstelėse priklauso nuo tarpląstelinio užpildo.
- 4. Žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos DLD1 ir HT29 ląstelių atsakas į poveikį frakcionuotos dozės JS priklauso nuo tarpląstelinio užpildo. Ląstelės ciklo, DNR pažaidų ir imuninio atsako keliuose dalyvaujantys genai, kurių raiška kito DLD1 ir HT29 ląstelėse, yra potencialūs molekuliniai taikiniai spindulinės terapijos tobulinimui.

MOKSLINIŲ DARBŲ SARAŠAS

1. Stankevicius V, Vasauskas G, Bulotiene D, Butkyte S, Jarmalaite S, Rotomskis R, Suziedelis K. (2016) Gene and miRNA expression signature of Lewis lung carcinoma LLC1 cells in extracellular matrix enriched microenvironment. BMC Cancer. 2016 Oct 11;16(1):769.

2. Stankevicius V, Vasauskas G, Noreikiene R, Kuodyte K, Valius M, Suziedelis K (2016) Extracellular matrix-dependent pathways in colorectal cancer cells lines reveal targets for anticancer therapies. Anticancer Research. 36(9):4559-67.

3. **Stankevicius V,** Kuodyte K, Schveigert D, Bulotiene D, Paulauskas T, Daniunaite K, Suziedelis K. Gene and miRNA expression profiles of mouse Lewis lung carcinoma LLC1 cells following single or fractionated dose irradiation. Oncology letters. **Priimtas spaudai.**

PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

1. Stankevicius V, Ceponyte R, Suziedelis K. Gene and miRNA expression regulation during cell growth in laminin rich ECM microenvironment. 21st century genetics: Genes at work, Cold Spring Harbor Laboratorija, Niujorkas, JAV, 2015.05.26-31;

2. Stankevicius V, Ceponyte R, Schveigert D, Venius J, Valuckas KP, Aleknavicius E, Rotomskis R, Suziedelis. Cellular Response To Ionizing Radiation: application of different murine models. 9th International scientific conference: The Vital Nature Sign, Kaunas, Lietuva, 2015.05.14-16;

3. Stankevicius V, Ceponyte R, Strainiene E, Laurinavicius S, Aleknavicius E, Suziedelis K. Cellular response to ionizing radiation in different murine cell culture models. EMBO/EMBL Symposium: Tumour microenvironment and signalling, Heidelbergas, Vokietija, 2014.05.07-10.

4. Ceponyte R, **Stankevicius V.** Cell culture model to investigate cellular response to ionizing radiation. XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society, Birštonas, Lietuva 2014.06.17-20

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė	Vaidotas Stankevičius				
Gimimo data	1987 02 12				
Darbo adresas	Nacionalinis vėžio institutas Santariškių 1A Vilnius				
Telefonas	+37068313680				
E-paštas	vaidotas.stankevicius@nvi.lt				
Išsilavinimas					
2005 – 2009	Biochemijos bakalauras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)				
2009 – 2011	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)				
2011 – 2015	Biochemijos doktorantas Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)				
Darbo patirtis					
2011	Vyresnysis specialistas, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra				
2011 – dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas, Nacionalinis vėžio institutas				

PADĖKA

Pirmiausia norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo darbo vadovui dr. Kęstučiui Sužiedėliui už galimybę dirbti molekulinės onkologijos laboratorijoje ir pagalbą ruošiant publikacijas ir disertaciją bei mokslines diskusijas. Taip pat norėčiau padėkoti savo visiems bendradarbiams už patarimus ir pagalbą darbo laboratorijoje metu.

Esu dėkingas prof. dr. Nils Cordes (OncoRay centras, Dresdenas) ir jo komandai už galimybę įsisavinti darbo su 3D ląstelių kultūromis subtilybes.

Taip pat norėčiau padėkoti dr. Sonatai Jarmalaitei ir Kristinai Daniūnaitei už pagalba hibridizuojant miRNR mikrogardeles, dr. Mindaugui Valiui už pagalbą vaizdinant konfokaliniu mikroskopu bei Stasei Butkytei už vertingus patarimus atliekant tikro laiko miRNR PGR.

Didžiausia padėka atintenka mano tėvams, Simonai, Hesei, Tomui, Karolinai ir Gintautui už didelį palaikymą ruošiant disertaciją ir begalinę kantrybę. Ačiū jums labai!

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the changes in genome-wide gene and miRNA expression in tumour cells cultivated under different cellular microenvironment conditions after the exposure to a single dose or a fractionated dose irradiation.

Our results revealed that the gene and miRNA signatures of LLC1 cells exposed to irradiation were dose delivery type dependent. The gene pathway enrichment analysis indicated that the extent of differential expression of genes involved in the P53, cell cycle, apoptosis and immune response categories was the most robust after exposure to FD. Furthermore, the miRNA target analysis demonstrated a significant correlation between differential expression of genes and miRNAs. Therefore, despite the indication that the LLC1 tumor response to fractionated irradiation could be extensively influenced by tumor microenvironment, the present study suggests key pathways involved in radiation induced response of murine cancer cells exposed to irradiation. Data presented in this study can be further applied to improve the outcome and the development of radiotherapy in preclinical animal model settings.

Furthermore, the present pathway enrichment results indicated the MAP kinase, cell adhesion and immune response as the most significantly altered functional categories in LLC1, DLD1 and HT29 cells during the switch from 2D to 3D. Global miRNA expression analysis confirmed the involvement of miRNA in the regulation of ECM dependent properties of cancer cells. Comparison of the expression levels of selected genes and miRNA between LLC1 cells grown 3D cell culture and LLC1 tumors implanted in mice indicated correspondence between both model systems. Therefore, the present results indicate the existence of universal regulation for the MAPK, cell adhesion and immune response pathways both in 3D culture and tumor suggesting the most promising directions for translational cancer research using the 3D cell culture models.

Finally, fractionated dose irradiation resulted in different genome wide expression profile when compared to single dose treatment in colorectal cancer DLD1 and HT29 cells grown under 3D culture conditions. Despite the fact that a higher number of genes with altered expression were down-regulated in both cell lines after irradiation, cell cycle/DNA damage or immune response genes have been most significantly up-regulated following irradiation in 3D conditions cultured DLD1 and HT29 cell lines, respectively. Furthermore, the expression signature of selected genes following FD treatment was dependent on cell culture conditions and resulted in higher expression in cells grown under 3D conditions. In addition, we demonstrated higher radiotolerance in both cell lines under 3D cell culture conditions compared to 2D. These results indicate that cancer cell survival after IR treatment in addition to cellular P53 status is ECM dependent. Therefore, the data in the present study suggest that ECM based 3D cell culture models in combination with the fractionated dose treatment of ionizing radiation could accelerate the understanding of molecular mechanisms associated with therapy dependent radioresistance in tumors and promote the development of more efficient radiotherapy.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1 Barcellos-Hoff, M. H., C. Park and E. G. Wright (2005). "Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy." <u>Nat Rev Cancer</u> **5**(11): 867-875.

2 Camphausen, K., B. Purow, M. Sproull, T. Scott, T. Ozawa, D. F. Deen and P. J. Tofilon (2005). "Orthotopic Growth of Human Glioma Cells Quantitatively and Qualitatively Influences Radiation-Induced Changes in Gene Expression." <u>Cancer</u> <u>Research</u> **65**(22): 10389.

3 Delaney, G., S. Jacob, C. Featherstone and M. Barton (2005). "The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines." <u>Cancer</u> **104**(6): 1129-1137.

4 Feofanova, N., J. M. Geraldo and L. M. de Andrade (2014). "Radiation oncology in vitro: trends to improve radiotherapy through molecular targets." <u>Biomed Res Int</u> **2014**: 461687.

5 Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." <u>Methods</u> **25**(4): 402-408.

6 Lord, C. J. and A. Ashworth (2012). "The DNA damage response and cancer therapy." <u>Nature</u> **481**(7381): 287-294.

7 Nyga, A., U. Cheema and M. Loizidou (2011). "3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies." <u>J Cell Commun Signal</u> **5**(3): 239-248.

8 Paraskevopoulou, M. D., G. Georgakilas, N. Kostoulas, I. S. Vlachos, T. Vergoulis, M. Reczko, C. Filippidis, T. Dalamagas and A. G. Hatzigeorgiou (2013). "DIANAmicroT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows." <u>Nucleic Acids Research</u> **41**(Web Server issue): W169-W173.

9 Purdy, J. A. (2008). "Dose to normal tissues outside the radiation therapy patient's treated volume: a review of different radiation therapy techniques." <u>Health Phys</u> **95**(5): 666-676.

10 Tsai, M. H., J. A. Cook, G. V. Chandramouli, W. DeGraff, H. Yan, S. Zhao, C. N. Coleman, J. B. Mitchell and E. Y. Chuang (2007). "Gene expression profiling of breast, prostate, and glioma cells following single versus fractionated doses of radiation." <u>Cancer Res</u> **67**(8): 3845-3852.

11 Vlachos, I. S., N. Kostoulas, T. Vergoulis, G. Georgakilas, M. Reczko, M. Maragkakis, M. D. Paraskevopoulou, K. Prionidis, T. Dalamagas and A. G. Hatzigeorgiou (2012). "DIANA miRPath v.2.0: investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways." <u>Nucleic Acids Research</u> **40**(Web Server issue): W498-W504.

12 Wang, J., D. Duncan, Z. Shi and B. Zhang (2013). "WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013." <u>Nucleic Acids Research</u> **41**(W1): W77-W83.