

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Eglė  
KUKCINAVIČIŪTĖ

Chemoterapiniams vaistams atsparių  
kolorektalinio vėžio ląstelių HCT116  
atsako į citotoksinį poveikį molekuliniai  
aspektai

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
biochemija N 004

---

VILNIUS 2019

Disertacija rengta 2014 – 2018 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biomokslų institute.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (SEN-17/2015).

**Moksliniai vadovai:**

**prof. dr. Vida Kirvelienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004). Nuo 2014-10-01 iki 2015-09-14.

**doc. dr. Aušra Sasnauskienė** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004). Nuo 2015-09-15 iki 2018-09-30.

# TURINYS

SANTRUMPOS .....	5
ĮVADAS .....	6
MOKSLINIS NAUJUMAS .....	8
GINAMIEJI TEIGINIAI .....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	11
1.1 Kolorektalinis vėžys.....	11
1.2 Chemoterapinių vaistų ir fotodinaminio poveikio mechanizmai .....	13
1.3 Wnt ir Notch signaliniai keliai .....	18
1.4 Autofagija.....	33
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	41
2.1 Gaminamų buferių sudėtis .....	41
2.2 Ląstelių linijos.....	41
2.3 Citotoksiniai preparatai ir slopikliai.....	42
2.4 Ląstelių inkubacija su 5-FU arba OxaPt .....	42
2.5 Ląstelių inkubacija su mTHPC .....	44
2.6 Ląstelių transfekcija siRNR .....	44
2.7 Ląstelių gyvybingumo testai .....	46
2.8 Ląstelių viduje susikaupusio mTHPC matavimas.....	47
2.9 Genų raiškos palyginimas pagal transkriptų kiekį .....	48
2.10 Western blot analizė.....	49
2.11 LC3B baltymo pasiskirstymo ląstelėse vaizdinimas.....	51
2.12 Statistinė analizė .....	52
3. REZULTATAI.....	53
3.1 Ląstelių atsparumas chemoterapiniams vaistams arba fotodinaminiui poveikiui.....	53
3.2 Autofagija.....	57
3.3 Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumas.....	64
3.4 Notch1 signalinio kelio aktyvumas .....	68
3.5 Transkripcijos represorius HES1 .....	71
4. DISKUSIJA .....	75
IŠVADOS.....	85

LITERATŪROS SĀRAŠAS.....	86
PRIEDAI .....	108
PUBLIKACIJŪ SĀRAŠAS .....	110
PRISTATYMAI KONFERENCIJOSE.....	110
PADĒKA.....	111
CURRICULUM VITAE .....	112
UŽRAŠAMS .....	113

## SANTRUMPOS

- 2D modelis – ląstelės kultivuojamos monosluoksniu  
3D modelis – iš ląstelių suformuojami sferoidai  
5-FU – 5-fluoruracilas  
CMS – sutartinis molekulinis subtipas (angl. *consensus molecular subtype*)  
CQ – chlorokvino difosfatas  
CTB – ląstelių gyvybingumo nustatymo metodas naudojant CellTiter-Blue® reagentą  
CTNNB1 –  $\beta$ -kateniną koduojantis genas  
CTT – citotoksiškumas  
FDP – fotodinaminis poveikis  
IC<sub>50</sub> – vaisto dozė, kuri nužudo 50% ląstelių arba 50% sumažina santykinį sferoido tūrį  
JSA – jaučio serumo albuminas  
K – kontrolinės t.y. vaistu neveiktos ląstelės  
KV – ląstelių gyvybingumo nustatymo metodas naudojant dažą kristalinį violetinį  
LC3B-I – citoplazminė LC3B baltymo forma  
LC3B-II – prie autofagosomų membranos prijungta LC3B baltymo forma  
MAP1LC3B – LC3B baltymą koduojantis genas  
mTHPC – 5,10,15,20-tetrakis-(mezo-hidroksifenil)-chlorinas  
MTT – ląstelių gyvybingumo nustatymo metodas naudojant MTT reagentą  
NDS – natrio dodecilsulfatas  
NICD1 – viduląstelinis Notch1 receptoriaus domenas  
NVS – negimusio veršelio serumas  
OxaPt – oksaliplatina  
RO –  $\gamma$ -sekretazės slopiklis RO4929097  
XAV – tankirazių slopiklis XAV939

## ĮVADAS

Kolorektalinis vėžys užima trečią vietą pasaulyje tarp dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų (Ferlay *et al.*, 2015). Po operacijos III stadijos ir didelės rizikos II stadijos vėžio atvejais bei pacientams, kuriems pirminės diagnozės metu nustatomos metastazės, dažnai skiriama chemoterapija derinant 5-fluoruracilą (5-FU) su kalcio folinatu ir oksaliplatina (OxaPt) (Cuyle ir Prenen, 2017). Visgi, nepaisant pažangos šio vėžio diagnostikoje bei gydyme, beveik pusė pacientų neišgyvena (Ferlay *et al.*, 2015). Viena iš galimų to priežasčių – įgimtas arba gydymo metu įgytas vėžio ląstelių atsparumas chemoterapiniams vaistams (Dallas *et al.*, 2009; Punt ir Tol, 2009).

Fotodinaminis poveikis (FDP) remiasi vėžinėse ląstelėse sukaupto fotosensibilizatoriaus aktyvacija regimąja šviesa, dėl kurios susidaręs  $^1\text{O}_2$  oksiduoja ląstelės biomolekules ir tokiu būdu sukelia ląstelių žūtį. Nustatyta, kad FDP gali būti veiksmingas prieš chemoterapiniams vaistams atsparias ląsteles (Goler-Baron ir Assaraf, 2012; Kulbacka *et al.*, 2010; Celli *et al.*, 2011; Yu ir Yu, 2014). Be to, kai kuriais atvejais FDP derinys su chemoterapiniu vaistu veikia adityviai net ir prieš tas ląsteles, kurios paprastai yra atsparios šiam chemoterapiniam vaistui (Spring *et al.*, 2015).

Atsparumas chemoterapiniams vaistams gali būti susijęs su pakitusia įvairių ląstelės procesų aktyvacija. Šiuo metu žinoma, kad su atsparumu galėtų būti susijęs apoptozės arba kitų ląstelės žūties kelių slopinimas, išgyvenimą skatinančių kelių aktyvacija, vaisto išmetimas iš ląstelės arba detoksikacija, intensyvesnis pažaidų taisymas ir kiti (Fodale *et al.*, 2011; Holohan *et al.*, 2013). Daugėja duomenų, kad į kai kurių chemoterapinių vaistų sukeltą stresą reaguodamos ląstelės gali suintensyvinti autofagiją ir tokiu būdu pašalinti pažeistus ląstelės komponentus. Visgi, neaišku ar autofagija svarbi kolorektalinės karcinomos ląstelių atsparumui 5-FU arba OxaPt.

Žarnyno kamieninių ląstelių dalijimąsi ir diferenciaciją valdo daug signalinių kelių, tarp kurių yra ir Wnt bei Notch signaliniai keliai (van der Flier ir Clevers, 2009). Dėl sutrikusios reguliacijos šie signaliniai keliai gali tapti nuolat aktyviais bei skatinti kolorektalinių navikų atsiradimą ir progresavimą (Roy ir Majumdar, 2012; Wu *et al.*, 2013; Pandurangan *et al.*, 2018). Taip pat manoma, kad Wnt bei Notch signaliniai keliai galėtų prisidėti ir prie vėžio ląstelių atsparumo chemoterapiniams vaistams (Saif ir Chu, 2010). Kadangi šie signaliniai keliai svarbūs ląstelių tarpusavio bendravimui, būtų prasminga jų aktyvumo tyrimus atlikti ne tik ląstelės

kultivuojant monosluoksniu, bet ir iš jų formuojant sferoidus. Palyginus su monosluoksniu modeliu, sferoiduose stebima daugiau ląstelė-ląstelė sąveikų, susidaro deguonies bei maisto medžiagų gradientai bei skirtingos ląstelių proliferacinės zonos (Nath ir Devi, 2016).

Šio **darbo tikslas** – įvertinti Wnt ir Notch signalinių kelių bei autofagijos reikšmę žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelių HCT116 bei chemoterapiniams vaistams atsparių sublinijų atsakui į 5-fluoruracilo ir oksaliplatinos citotoksinį poveikį.

Tikslui pasiekti buvo išskirti tokie **uždaviniai**:

- Įvertinti HCT116 ir HCT116/FU ląstelių išgyvenimą ir autofagijos intensyvumą po mTHPC-FDP bei jo derinio su 5-FU;
- Palyginti autofagijos intensyvumą, Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių aktyvaciją HCT116 ląstelėse ir chemoterapiniams vaistams atspariose sublinijose HCT116/FU ir HCT116/OXA po poveikio 5-FU arba OxaPt;
- Nustatyti Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch signalinių kelių bei autofagijos reikšmę HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių atsparumui 5-FU arba OxaPt.

## MOKSLINIS NAUJUMAS

Šiame darbe pirmą kartą parodėme, kad 5-FU atspariose HCT116/FU ląstelėse yra didesnis Wnt/ $\beta$ -katenino (2D kultūroje), Notch1 (2D ir 3D kultūrose) signalinių kelių aktyvumas bei didesni HES1 baltymo kiekiai (2D ir 3D kultūrose), o 2D ląstelių kultūroje šios ląstelės pasižymi didesniu autofagosomų kiekiu nei HCT116 ląstelės. Tuo tarpu 5-FU ir OxaPt atspariose HCT116/OXA ląstelėse stebimas didesnis Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių aktyvumas (tik 2D kultūroje) ir didesni HES1 baltymo kiekiai (2D ir 3D kultūrose), o 2D ląstelių kultūroje šios ląstelės pasižymi mažesniu autofagosomų kiekiu nei HCT116 ląstelės. Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumas anksčiau buvo tirtas tik 5-FU atspariose kolorektalinės karcinomos ląstelėse (Ayadi *et al.*, 2015). Be to, kitų autorių tyrimuose buvo vertintas tik NOTCH1 baltymo kiekis 5-FU arba OxaPt atspariose kolorektalinės karcinomos ląstelėse (Dinicola *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015), bet nebuvo vertinta šio receptoriaus aktyvacija.

Pirmieji įvertinome mTHPC-FDP veiksmingumą ir jo derinimo 5-FU galimybes chemoterapiniams vaistams atspariose ir jautriose žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelėse. Nustatėme, kad mTHPC-FDP yra veiksmingas prieš chemoterapiniams vaistams atsparias kolorektalinės karcinomos ląsteles, tačiau nekeičia ląstelių įgyto atsparumo 5-FU poveikiui. Įvertinę autofagijos vyksmą kolorektalinės karcinomos ląstelėse parodėme, kad pavienis mTHPC-FDP slopina autofagijos srautą. Derindami mTHPC-FDP su 5-FU pastebėjome, kad autofagosomų kiekis priklauso nuo FDP komponentės, o 5-FU pridėjimas skirtingai veikia autofagijos srautą chemoterapiniams vaistams jautriose bei atspariose ląstelėse.

Taip pat parodėme, kad 5-FU poveikis sumažina HES1 baltymo kiekį, Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių aktyvaciją visose tirtose ląstelėse. Nustatėme, kad kaip ir HCT116 ląstelėse (Liu *et al.*, 2016), chemoterapiniams vaistams atspariose ląstelėse 5-FU mažina autofagijos srautą. Mūsų duomenys rodo, kad Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimas XAV (2D ir 3D kultūroje) ir Notch signalinio kelio slopinimas RO (tik 3D kultūroje) padidina 5-FU citotoksiškumą chemoterapiniams vaistams atsparioms HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms. Tuo tarpu HES1 baltymo kiekio sumažinimas didina visų tirtų ląstelių atsparumą 5-FU, o ATG7 baltymo kiekio sumažinimas siRNR neturi įtakos 5-FU citotoksiškumui.



Parodėme, kad OxaPt poveikis sumažina Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių aktyvaciją tik OxaPt poveikiui jautriose HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. Be to, šis poveikis didina autofagijos srautą visose tirtose ląstelėse. Nustatėme, kad Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimas XAV sumažina OxaPt citotoksiškumą HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėms, kultivuojamoms 2D kultūrose. Tuo tarpu 3D ląstelių kultūrose XAV skirtingai veikia OxaPt citotoksiškumą: HCT116/FU ląstelėse – sumažina, HCT116/OXA – padidina, o HCT116 ląstelėse – neturi įtakos. Notch signalinio kelio slopinimas RO, HES1 bei ATG7 baltymų kiekių sumažinimas siRNR didina visų tirtų ląstelių linijų atsparumą OxaPt.

## GINAMIEJI TEIGINIAI

- mTHPC-FDP yra veiksmingas prieš HCT116/FU ląsteles, bet nekeičia ląstelių įgyto atsparumo 5-FU poveikiui.
- Chemoterapiniams vaistams atspariose kolorektalinės karcinomos ląstelėse HCT116/FU (atspausnės 5-FU poveikiui) ir HCT116/OXA (atspausnės 5-FU ir OxaPt poveikiams) yra padidėjusi Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių aktyvacija.
- Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch signaliniai keliai yra reikšmingi kolorektalinio vėžio ląstelių išgyvenimui arba žūčiai po 5-FU ir OxaPt poveikių, o autofagija – šių ląstelių žūčiai po OxaPt poveikio.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1 Kolorektalinis vėžys

Kolorektalinis vėžys – storosios arba tiesiosios žarnos navikas, kuris yra vienas iš dažniausiai diagnozuojamų vėžinių susirgimų Lietuvoje (9% diagnozuotų vėžio atvejų ir 11% visų mirčių nuo vėžio) bei pasaulyje (atitinkamai – 9,7% ir 8,5%) (Lietuvos vėžio registras, 2012; Ferlay *et al.*, 2015). Pagrindinis kolorektalinio vėžio gydymo būdas – chirurginis naviko pašalinimas, kuris tinkamas lokalizuoto vėžio atveju (t.y. 70 – 80% visų pacientų). Visiems III stadijos ir didelės rizikos II stadijos vėžio atvejais po operacijos skiriama adjuvantų terapija siekiant sunaikinti mikrometastazes bei sumažinti ligos atsinaujinimo riziką. Šiuo atveju dažniausiai skiriama chemoterapija 5-fluoruracilu (5-FU) su kalcio folinatu (pagal Mayo arba De Gramont schemas), kapecitabinu arba šių vaistų deriniais su oksaliplatina (OxaPt) pagal FOLFOX4 (5-FU/kalcio folinatas/OxaPt) arba XELOX (kapecitabinas/OxaPt) schemas (Sveikatos apsaugos ministerija, 2014). Visgi, liga atsinaujinta net 40 – 50% adjuvantine terapija gydytų pacientų, dažniausiai išsivystant metastazėms. Likusiems 20 – 30% pacientų metastazės aptinkamos jau pirminės diagnozės metu. Tokiu atveju gydymo taktika priklauso nuo ligos išplitimo. Dažnai skiriama chemoterapija pagal FOLFOX4 arba FOLFOX6, XELOX, FOLFIRI (5-FU/kalcio folinatas/irinotekanas), FOLFOXIRI (5-FU/kalcio folinatas/OxaPt/irinotekanas) schemas, kurios kai kuriais atvejais derinamos su takinių terapija (slopinami VEGF, VEGFR, TIE2, EGFR) (Sveikatos apsaugos ministerija, 2014; Cuyle ir Prenen, 2017).

Kolorektalinio vėžio kancerogenezei būdingas genomo nestabilumas, kuris gali būti lemiamas chromosomų nestabilumo, mikrosatelitų nestabilumo bei genų promotorių CpG salų metilinimo (Cuyle ir Prenen, 2017). Šis genomo nestabilumas lemia labai didelį naviką sudarančių ląstelių populiacijos heterogeniškumą. Dėl šios priežasties padidėja tikimybė, kad šioje ląstelių populiacijoje atsiras chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių, kurios gydymo metu išgyvens ir lems ligos atsinaujinimą.

Pagal biožymenis išskiriami keturi kolorektalinio vėžio subtipai (1.1 lentelė) (Guinney *et al.*, 2015). Tai naudojama prognozuojant kolorektalinio vėžio agresyvumą ir parenkant veiksmingiausią gydymo strategiją.

Vėžinių ląstelių atsparumas chemoterapiniams vaistams – daugelio pokyčių ląstelėje pasekmė. 2011 metais Fodale *et al.* apžvelgė geriausiai

ištirtus būdus, kaip ląstelės gali įgyti atsparumą: sumažėjus vaistų patekimui į ląstelę, padidėjus vaistų išnešimui iš ląstelės, sumažėjus vaisto aktyvacijai, padidėjus vaisto inaktyvacijai, pakitus vaisto sąveikai su taikiniu, pakitus išgyvenimo, apoptozės slopinimo bei DNR pažaidų taisymo signaliniams keliams (Fodale *et al.*, 2011). Atsparioms ląstelėms taip pat būdinga padidėjusi vaisto pernaša per vidines membranas (Larsen *et al.*, 2000), ląstelės metabolizmo pokyčiai (Zhao *et al.*, 2013), DNR sintezė esant neištaisytais pažaidoms (Doles *et al.*, 2010), autofagijos aktyvacija (Kibria *et al.*, 2014) ir kt.

**1.1 lentelė. Kolorektalinio vėžio subtipai, pagal (Thanki *et al.*, 2017)**

Tipas	CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
<b>Genomui būdingi požymiai</b>	Mikrosatelitų nestabilumas, didelis mutacijų, bet mažas kartotinių sekų kiekis, aukštas promotorių metilinimo laipsnis	Chromosomų nestabilumas, mažas-vidutinis mutacijų ir mažas kartotinių sekų kiekis, žemas promotorių metilinimo laipsnis	Chromosomų nestabilumas, vidutinis mutacijų ir mažas-vidutinis kartotinių sekų kiekis, vidutinis promotorių metilinimo laipsnis	Chromosomų nestabilumas, mažas mutacijų, bet didelis kartotinių sekų kiekis, žemas promotorių metilinimo laipsnis
<b>Mutavę genai</b>	<i>MSH6, RNF43, ATM, TGFBR2, BRAF, PTEN</i>	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA</i>	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA</i>	<i>APC, KRAS, TP53, PIK3CA</i>
<b>Molekuliniai požymiai</b>	Imuninės sistemos, JAK-STAT, kaspazių aktyvacija	Wnt signalinio kelio, <i>MYC, EGFR/SRC, VEGF/VEGFR</i> , integrinų, <i>TGFB, IGF</i> ir <i>IRS2</i> aktyvacija; <i>HNF4a, HER2</i> ir ciklinų raiškos padidėjimas	DNR klaidų taisymas, gliutaminolizė, lipidogenezė	Mezenchiminėms ląstelėms būdingos savybės, komplemento aktyvacija, imunosupresija, angiogenezės skatinimas
<b>Prognozė</b>	Pirminė – gera, po ligos atsinaujinimo – maži šansai išgyventi	Pirminė – labai gera, po ligos atsinaujinimo – gera	Jeigu yra KRAS mutacija, liga atsinaujina greičiau, maži šansai išgyventi	Didelė ligos atsinaujinimo rizika, mažiausi šansai išgyventi
<b>Adjuvantinė terapija</b>	I – II stadijoje neskiriama; III stadija – jautru FOLFOX, atsparu 5-FU	III stadijoje – standartinė	FOLFOX, taikinių terapija	Atsparu FOLFOX ir anti-EGFR terapijai



nebėgali katalizuoti dUMP virsmo į dTMP. Trūkstant dTMP, į DNR įterpiamas dUTP (Longley *et al.*, 2003).

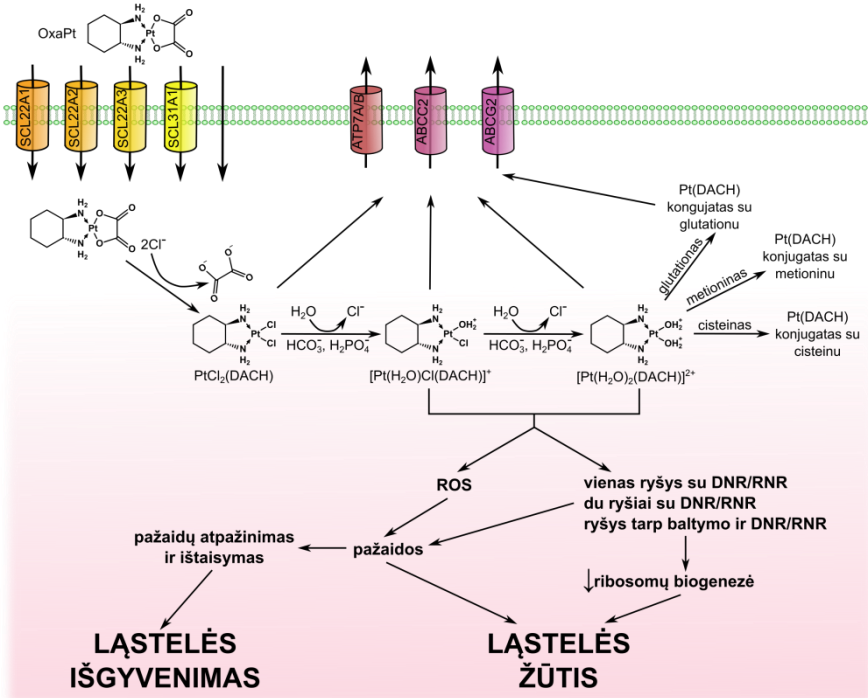
Kitas 5-FU metabolitas FdUTP replikacijos metu įterpiamas į DNR priešais A ir G (Wyatt ir Wilson, 2009). 5-FU/A porose esantį 5-FU gali iškirpti uracilo DNR glikozilazė (UDG) (Pettersen *et al.*, 2011). Visgi, esant dTTP trūkimui ląstelėse, UDG aktyvumas tik sustiprina 5-FU veikimą, nes pažaidos negali būti teisingai ištaisomos. Ląstelei vis bandant ištaisyti pažaidas kartojasi neteisingo įterpimo, iškirpimo ir taisymo ciklai, dėl kurių galiausiai atsiranda DNR grandinių trūkiai ir ląstelė žūsta (Longley *et al.*, 2003). Tuo tarpu 5-FU/G poras atpažįsta MutSα kompleksas. Po pažaidos atpažinimo šis kompleksas sąveikauja su MutLα kompleksu, kuris inicijuoja pažaidos taisymą arba aktyvuoja serino/treonino baltymų kinazės ATR/CHK1 tokiu būdu skatindamas apoptozę (Wyatt ir Wilson, 2009).

Aktyvus metabolitas FUTP yra įterpiamas į RNR. Tai sutrikdo potranskripcines rRNR, tRNR ir snRNR modifikacijas, slopina pre-iRNR splainingą bei iRNR poliadenilinimą (Longley *et al.*, 2003). Be to, RNR brendimo sutrikimai lemia ribosomų biogenezes stresą – į pre-rRNR įterptas 5-FU sutrikdo vėlyvuosius pre-rRNR brendimo etapus ir lemia laisvo ribosominio baltymo RPL3 kiekio padidėjimą. Pastebėta, kad šis baltymas yra ypač svarbus HCT116<sup>p53-/-</sup> ląstelių atsakai į 5-FU poveikį ir dalyvauja nuo p21 priklausomoje arba nepriklausomoje apoptozės indukcijoje (Esposito *et al.*, 2014).

5-FU poveikiui atspariose ląstelėse įvairiais būdais sumažinamas aktyvių 5-FU metabolitų kiekis: 1) 5-FU išnešamas iš ląstelės dalyvaujant ABCB5 (Kugimiya *et al.*, 2015), ABCC3, ABCC4, ABCC5 (Hagmann *et al.*, 2009), ABCC11 (Oguri *et al.*, 2007) ir ABCG2 (Yuan *et al.*, 2009) nešikliams; 2) dihidropirimidino dehidrogenazė katalizuoja 5-FU virsmą neaktyviu metabolitu 5,6-dihidrofluoruracilu (Longley *et al.*, 2003); 3) sumažėja 5-FU metabolinei aktyvacijai reikalingų fermentų raiška (Longley ir Johnston, 2005). Be to, atspariose ląstelėse gali sumažėti timidilato sintazės slopinimo lemiamas 5-FU citotoksiškumas. Tai gali nutikti padidėjus timidilato sintazės raiškai ir įvykus mutacijoms, kurios lemia pakitusią timidilato sintazės sąveiką su 5-FU (Temraz *et al.*, 2014) bei timidino kinazei katalizuojant T virsmą į dTMP (Grem ir Fischer, 1989). Atsparumas šiam vaistui taip pat siejamas su mažu apoptozę skatinančio baltymo BAX kiekiu bei padidėjusiais apoptozę slopinančių BCL2 ir BAD baltymų lygiais (Violette *et al.*, 2002).

## 1.2.2 Oksaliplatinos veikimo mechanizmas

Oksaliplatinina (OxaPt) – platinos junginys, turintis du ligandus – oksalato bidentatą ir 1,2-diaminocikloheksaną (DACH). OxaPt į ląstelę patenka paprastosios difuzijos ir palengvintos pernašos būdu dalyvaujant SLC22A1 (Ahlin *et al.*, 2008), SLC22A2 (Burger *et al.*, 2010), SLC22A3 (Yokoo *et al.*, 2008), SLC31A1 (Howell *et al.*, 2010) nešikliams. Ląstelės viduje oksalato bidentatas pakeičiamas Cl<sup>-</sup> jonais susidarant PtCl<sub>2</sub>(DACH), kuris toliau virsta aktyviomis OxaPt formomis ([Pt(H<sub>2</sub>O)Cl(DACH)]<sup>+</sup>, [Pt(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(DACH)]<sup>2+</sup>) (1.2 pav.) (Panczyk, 2014). Šie akvakompleksai nebegali difunduoti iš ląstelių ir reaguoja su ląstelėse esančiais nukleofilais (Riddell, 2018).



1.2 pav. OxaPt virsmas ląstelėje. Pagal (Panczyk, 2014; Bruno *et al.*, 2017; Jensen *et al.*, 2012; Reardon *et al.*, 1999; Ahlin *et al.*, 2008; Burger *et al.*, 2010; Yokoo *et al.*, 2008; Howell *et al.*, 2010; Alberto *et al.*, 2011; To *et al.*, 2016; Ceckova *et al.*, 2008; Tadini-Buoninsegni *et al.*, 2014)

Branduolyje OxaPt akvakompleksai reaguoja su purinų septintuoju azoto atomu susidarant pirmajam kovalentiniui ryšiui tarp OxaPt ir DNR (Alberto *et al.*, 2011). Toliau OxaPt atakuoja kitą erdviškai arti esantį nukleofilą susidarant antrajam OxaPt ryšiui su DNR arba DNR-OxaPt-baltymas sąryšoms (Jensen *et al.*, 2012; Reardon *et al.*, 1999). Nustatyta, kad OxaPt dažniausiai sudaro sąryšas tarp toje pačioje DNR grandinėje vienas šalia kito

esančių GG (60-65% iš visų OxaPt-DNR sąryšių) ir AG (25-30%). Tuo tarpu vidugrandininės DNR GNG (5-10%) ir tarp skirtingų DNR grandinių susidarančios GG (1-3%) sąryšos yra daug retesnės (Chaney *et al.*, 2005). Ilgą laiką buvo manyta, kad būtent OxaPt-DNR sąryšių susidarymas atsakingas už OxaPt citotoksiškumą ląstelėms. Visgi, pastebėta, kad OxaPt sudaro daug mažiau sąryšių su DNR nei cisplatina (Raymond *et al.*, 2002) ir yra veiksminga prieš cisplatinai atsparias ląsteles (Martelli *et al.*, 2009). Dėl to pradėta ieškoti kitų mechanizmų, kurie paaiškintų OxaPt citotoksiškumą.

2017 metais Bruno su kolegomis nustatė, kad OxaPt nužudo ląsteles sukeldama ribosomų biogenezės stresą, kuris greitai indukuoja nuo p53 priklausomą ląstelės žūtį. Atsako į OxaPt metu anksti aktyvuojamas p21, tuo pačiu padidėja S18 pozicijoje fosforilinto p53 bei bendras p53 kiekis. Sumažėjus pre-rRNR, padaugėja laisvo ribosominio baltymo RPL11, kuris jungiasi su MDM2 ir neleidžia MDM2 jungtis prie p53. Be to, nutildžius RPL11 sumažėja OxaPt citotoksiškumas (Bruno *et al.*, 2017). Su OxaPt, kaip ir 5-FU, sukeliama ribosomų biogenezės stresu taip pat siejamas ir laisvo RPL3 kiekio padidėjimas (Esposito *et al.*, 2014). Keliamos hipotezės, kad OxaPt gali sukelti ribosomų biogenezės stresą aktyviems jos akvakompleksams reaguojant su rRNR koduojančia DNR, pačia rRNR, iRNR koduojančia ribosominiais baltymais arba su ribosominiais baltymais (Bruno *et al.*, 2017).

Ląstelės geba sumažinti viduląstelinę OxaPt koncentraciją keliais būdais: 1) išnešdamos vaistą iš ląstelės dalyvaujant ABCC2 (To *et al.*, 2016), ABCG2 (Ceckova *et al.*, 2008), ATP7A ir ATP7B (Tadini-Buoninsegni *et al.*, 2014) nešikliams; 2) vykstant OxaPt inaktyvacijai, kuri susijusi su aktyvių akvakompleksų konjugacija su L-glutationu (dalyvaujant glutationo S-transferazei), L-cisteinu arba L-metioninu ir susidariusių konjugatų pašalinimu iš ląstelės (Panczyk, 2014). Atsparumas OxaPt taip pat padidėja dėl padidėjusios ląstelių gebos toleruoti/ištaisyti OxaPt sukeliamas pažaidas. Su tuo siejama padidėję DNR pažaidų taisyme iškerpant nukleotidus dalyvaujančių ERCC1 ir XPF baltymų kiekiai, taisyme iškerpant pažeistas heterociklines bazes dalyvaujančios DNR polimerazės  $\beta$  kiekiai, pažaidos apėjimui svarbių DNR polimerazių  $\eta$  ir  $\zeta$  bei deoksicitidilo transferazės REV1 kiekiai (Martinez-Balibrea *et al.*, 2015). Taip pat pastebėta, kad atsparumas OxaPt gali būti siejamas su apoptozės slopinimu (padidėjus BAX, IAP4 bei sumažėjus BCL2 baltymų kiekiams), nekroptozės slopinimu (padidėjus CHIP ir cFLIPL baltymų kiekiams) bei autofagijos slopinimu arba aktyvacija (Martinez-Balibrea *et al.*, 2015; Razaghi *et al.*, 2018).

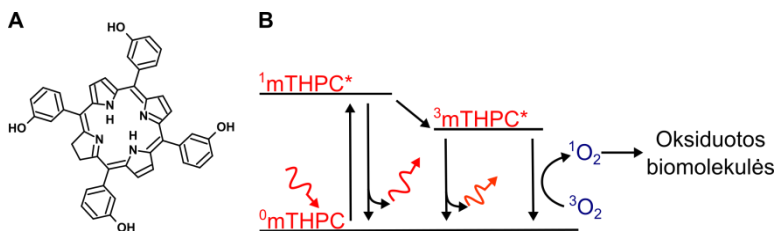


Be to, Wnt signalinio kelio neigiamo regulatoriaus APC baltymo kiekio sumažėjimas siejamas su padidėjusiu atsparumu OxaPt (Bruno *et al.*, 2017).

### 1.2.3 mTHPC-FDP mechanizmas

Fotodinaminio poveikio (FDP) metu šviesai jautriai medžiagai (fotosensibilizatoriui) sugėrus fotoną susidaro aktyvios deguonies formos, kurios sukelia biomolekulių pažeidimus. FDP principu pagrįsta terapija naudojama gydant įvairius vėžinius susirgimus (Allison, 2014). I-III fazės klinikiniai tyrimai atliekami tiriant FDP veiksmingumą kolorektalinio vėžio gydymui (Kawczyk-Krupka *et al.*, 2015). Tam naudojami porfirinai, chlorinai bei ftalocianinai (Kawczyk-Krupka *et al.*, 2016).

Antros kartos fotosensibilizatorius mTHPC – 5,10,15,20-tetrakis-(mezo-hidroksifenil)-chlorinas – chlorino darinys, turintis keturias hidroksifenilgrupes (1.3 pav. A). Tai šviesai jautrus junginys ( $\lambda_{\max}=650$  nm), naudojamas FDP (Senge ir Brandt, 2011). mTHPC sąveikauja su lipoproteinais, kurie endocitozės būdu patenka į ląstelės vidų (Senge ir Brandt, 2011). Priklausomai nuo ląstelių tipo ir inkubacijos su mTHPC sąlygų jis gali būti kaupiamas mitochondrijų (Chen *et al.*, 2000), endoplazminio tinklo, Goldžio kompleksso (Teiten *et al.*, 2003; Marchal *et al.*, 2007) arba lizosomų (Leung *et al.*, 2002) membranose. Nustatyta, kad ląstelėse mTHPC metabolizmas nevyksta (Senge ir Brandt, 2011).



1.3 pav. mTHPC struktūra (A) ir energijos pernaša (B). Pagal (Senge ir Brandt, 2011)

Tamsoje mTHPC yra mažai toksiškas ląstelei (Reidy *et al.*, 2012). Sugėrus fotoną jis pereina į sužadintą vienlypę būseną. Iš jos vykstant tarpisteminiui šuoliui pereina į ilgai gyvuojančią trilypę būseną. Trilypės būsenos mTHPC perneša energiją nesusžadintos būsenos deguonies molekulei (Senge ir Brandt, 2011) (1.3 pav. B). Šio proceso metu susidaręs vienlypis deguonis  $^1\text{O}_2$  sukelia biomolekulių pažeidimus ir ląstelėse gali inicijuoti apoptozę (Marchal *et al.*, 2005), nekrozę (Marchal *et al.*, 2005) arba autofagiją (Sasnauskienė *et al.*, 2009). Kai kurie tyrimai rodo, kad FDP gali būti veiksmingas prieš chemoterapiniams vaistams atsparias ląsteles (Goler-Baron ir Assaraf, 2012; Kulbacka *et al.*, 2010; Celli *et al.*, 2011; Yu ir Yu, 2014).

### 1.3 Wnt ir Notch signaliniai keliai

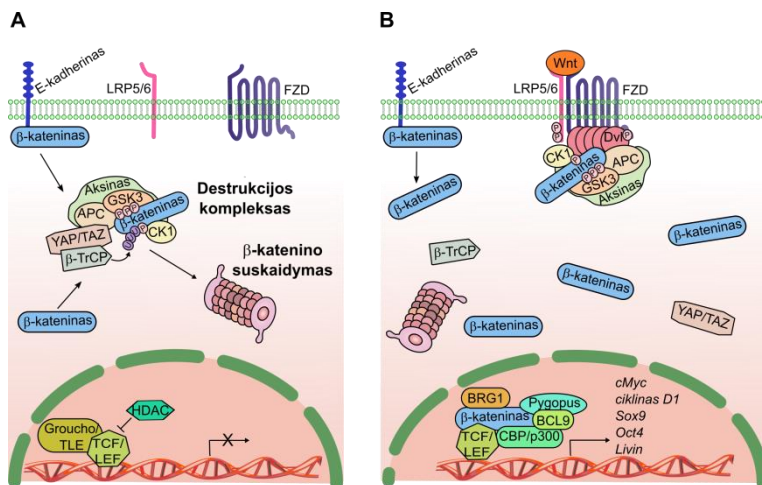
Storosios žarnos paviršių sudaro vienas epitelinių ląstelių sluoksnis, kuris atlieka dvi funkcijas – dalyvauja vandens ir maisto medžiagų absorbcijoje bei saugo kūną nuo galimai žalingo žarnyno turinio. Šios funkcijos užtikrinamos vykstant nuolatiniam epitelinio sluoksnio atsinaujinimui – žarnyno epitelio kriptų apačioje esančios kamieninės ląstelės dalinasi asimetriškai susidarant dukterinėms nekamieninėms ląstelėms, kurios dar pasidalina 4 – 5 kartus, kol galutinai diferencijuoja į enterocitus (absorbuoja), enteroendokrinines (sekretuoja hormonus) ir taurines ląsteles (sekretuoja gleives). Vykstant nuolatiniam kamieninių ląstelių dalinimuisi, diferencijuojamos ląstelės juda link kriptos viršaus kur galiausiai žūsta ir yra išstumiamos į žarnyno lumeną (van der Flier ir Clevers, 2009; Koch, 2017). Nustatyta, kad daugumos pilnai diferencijavusių žarnyno epitelio ląstelių pakeitimui naujomis užtenka maždaug 2 – 7 dienų (Tanaka, 2009; Barker, 2014). Tokiu būdu sumažinama individualios žarnyno epitelinės ląstelės sąveika su patogenais bei greitai atstatomos infekcijų arba mechaninio poveikio sukeltos žarnyno pažaidos (Koch, 2017). Žarnyno kamieninių ląstelių dalijimąsi ir diferenciaciją valdo Wnt ir Notch signaliniai keliai (van der Flier ir Clevers, 2009). Pastebėta, kad sutrikus šių signalinių kelių reguliacijai bei esant nuolatinei aktyvacijai skatinamas kolorektalinių navikų atsiradimas ir progresavimas (Roy ir Majumdar, 2012; Wu *et al.*, 2013; Pandurangan *et al.*, 2018).

#### 1.3.1 Wnt signalinis kelias

Wnt šeimą sudaro sekretuojami palmitoleininti glikoproteinai, kurie sąveikauja su Frizzled (FZD) receptoriais bei įvairiais koreceptoriais ir aktyvuoja nuo  $\beta$ -katenino, JNK,  $Ca^{2+}$  ir kitų signalinių molekulių priklausomus signalinius kelius (Rasmussen *et al.*, 2018). Šiuo metu žinoma 19 žmogaus WNT glikoproteinų, 10 FZD receptorių bei keli nekanoniniai receptoriai (pavyzdžiui, tirozino kinazės RYK, ROR1, ROR2). Skirtingi ligando, receptoriaus ir koreceptoriaus deriniai lemia koks signalinis kelias bus aktyvuotas (Deitrick ir Pruitt, 2016).

**Wnt/ $\beta$ -katenino kelias (kanoninis Wnt signalinis kelias).**  $\beta$ -kateninas ląstelėse atlieka dvi pagrindines funkcijas: 1) didžioji  $\beta$ -katenino dalis jungia E-kadherino citoplazminį domeną su ląstelės citoskeletu (ląstelė-ląstelė sąauga); 2) laisvas citoplazminis  $\beta$ -kateninas keliauja į branduolį kur veikia kaip transkripcijos aktyvatorius (Deitrick ir Pruitt, 2016; Tortelote *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014a). Nesant WNT glikoproteinų, citoplazmoje

palaiškoma maža laisvo  $\beta$ -katenino koncentracija, jį suskaidant.  $\beta$ -katenino destrukcijos kompleksą sudaro pamatinis destrukcijos komplekso baltymas AXIN (prisijungia naujai susintetintą arba nuo E-kadherino atpalaiduotą  $\beta$ -kateniną), APC baltymas bei  $\beta$ -kateniną fosforilinančios kinazės – kazeino kinazė CK1 (fosforilina S45), serino/treonino kinazė GSK3 $\beta$  (fosforilina S33, S37, T41) (Tortelote *et al.*, 2017). Prie destrukcijos komplekso per APC prisijungia YAP/TAZ baltymai. Jie pritraukia E3 ubikvitino ligazę  $\beta$ -TrCP, kuri poliubikvitilina fosfo- $\beta$ -kateniną ir nukreipia jį suskaidymui proteasomose (Zhan *et al.*, 2017) (1.4 pav.). Proteasomai pašalinus  $\beta$ -kateniną iš destrukcijos komplekso, šis pagauna kitą citoplazminį  $\beta$ -kateniną ir jį pažymi degradacijai (Tortelote *et al.*, 2017).



**1.4 pav. Kanoninis Wnt signalinis kelias.** A, nesant ligando destrukcijos kompleksas fosforilina ir ubikvitilina  $\beta$ -kateniną, todėl jis suskaidomas proteasomose. B, esant Wnt ligandams  $\beta$ -kateninas nebeskaidomas ir branduolyje skatina Wnt taikinių raišką. Pagal (Tortelote *et al.*, 2017; Kretschmar ir Clevers, 2017; Deitrick ir Pruitt, 2016; Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018)

Kanoninis kelias aktyvuojamas WNT glikoproteinams sudarius kompleksą su FZD receptoriais ir LRP koreceptoriumi. Tikslus mechanizmas kaip šio komplekso susidarymas sutrikdo  $\beta$ -katenino destrukcijos komplekso veikimą vis dar nežinomas. Eksperimentiniai duomenys rodo, kad susidarius aktyviam WNT/FZD/LRP kompleksui vyksta DVL baltymo fosforilinimas, LRP viduląstelinio fragmento PPPSP pasikartojimų fosforilinimas bei viso destrukcijos komplekso pritraukimas prie aktyvaus receptoriaus (Deitrick ir Pruitt, 2016; Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018; Kretschmar ir Clevers, 2017). Teigiama, kad aktyvaus receptoriaus sąveika su destrukcijos kompleksu neleidžia  $\beta$ -TrCP vykdyti fosfo- $\beta$ -katenino ubikvitilinimo, todėl  $\beta$ -kateninas nesuskaidomas ir

destrukcijos kompleksas lieka „užkimštas“ (Tortelote *et al.*, 2017). Wnt signalas sustiprinamas susidarant signalosomai – aktyvūs receptoriaus kompleksai pritraukiami vienas šalia kito vykstant fosfo-DVL polimerizacijai, tai padidina DVL avidiškumą AXIN ir lemia dar didesnio destrukcijos kompleksų kiekio pritraukimą iš citoplazmos (Gammons ir Bienz, 2018).

$\beta$ -katenino skaidymas taip pat sumažėja ir dėl AXIN konformacijos pokyčių. Nesant WNT glikoproteinų, GSK3 $\beta$  fosforilina AXIN ir tokiu būdu padidina AXIN stabilumą bei afiniškumą  $\beta$ -kateninui (atvira AXIN konformacija). Tuo tarpu susidarius WNT/FZD/LRP kompleksui, baltymų fosfatazė PPI defosforilina AXIN ir jis pereina į uždarą konformaciją prie kurios nebegali prisijungti  $\beta$ -kateninas (Tortelote *et al.*, 2017; Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018; Krausova ir Korinek, 2014).

**1.2 lentelė. Wnt signalinio kelio aktyvuojamų genų pavyzdžiai**

Genai taikiniai	Apibūdinimas	Šaltiniai
<i>TCF1, LEF1, FZD7, LGR5, LRP6, RSPO</i>	Wnt signalinis kelias	(Roose <i>et al.</i> , 1999; Filali <i>et al.</i> , 2002; Willert <i>et al.</i> , 2002; Barker <i>et al.</i> , 2007; MacDonald <i>et al.</i> , 2009)
<i>AXIN2, DKK, ZNRF3, RNF43, NKD</i>	Wnt signalinio kelio slopinimas	(Jho <i>et al.</i> , 2002; Niida <i>et al.</i> , 2004; Kretzschmar ir Clevers, 2017; MacDonald <i>et al.</i> , 2009)
<i>MYC, JUN, PPAR, SOX2, SOX9, OCT4</i>	Transkripcijos veiksniai	(He <i>et al.</i> , 1998; Mann <i>et al.</i> , 1999; He <i>et al.</i> , 1999; Blache <i>et al.</i> , 2004; Cole <i>et al.</i> , 2008)
<i>ABCBI, ABCC3</i>	Vaistų išmetimas iš ląstelės	(Correa <i>et al.</i> , 2012; Kobayashi <i>et al.</i> , 2016)
<i>LIVIN, IAP4</i>	Apoptozės slopinimas	(Yuan <i>et al.</i> , 2007; Zhang <i>et al.</i> , 2001)
<i>NOTCH2, JAG1</i>	Notch signalinis kelias	(Ungerback <i>et al.</i> , 2011; Rodilla <i>et al.</i> , 2009)
<i>NRCAM, CLDN1, CHL1, FNI</i>	Ląstelių adhezija	(Conacci-Sorrell <i>et al.</i> , 2002; Miwa <i>et al.</i> , 2001; Gavert <i>et al.</i> , 2005; ten Berge <i>et al.</i> , 2008)

Sutrikus naujai susintetinto  $\beta$ -katenino skaidymui didėja jo koncentracija citoplazmoje ir dalis  $\beta$ -katenino keliauja į branduolį. Branduolyje  $\beta$ -kateninas pakeičia su TCF/LEF šeimų transkripcijos veiksniais sąveikaujančius transkripcijos represorius TLE bei lemia chromatinio struktūrą modifikuojančių veiksnių (BRG1, CBP, p300, BCL9, Pygopus, SET1, CARM, TBP bei kitų), transkripcijos elongacijos veiksnio ir RNR polimerazės II pritraukimą (Tortelote *et al.*, 2017). Priklausomai nuo konkrečių TCF/LEF transkripcijos veiksnių splaisingo variantų bei pritrauktų transkripcijos aktyviklių skatinama skirtingų Wnt taikinių raiška (1.2 lentelė) (Kretzschmar ir Clevers, 2017). Pavyzdžiui, pritraukus p300 skatinama ląstelių diferenciacija, o CBP – palaikomas kamieniškumas (Deitrick ir Pruitt, 2016). Taip pat daugėja duomenų, kad  $\beta$ -kateninas gali pritraukti ir transkripcijos represorių, tokiu būdu slopindamas tam tikrų genų

raišką (MacDonald *et al.*, 2009). Teigiama, kad bendras  $\beta$ -katenino lygis ląstelėse nėra labai svarbus, nes transkripcijos reguliacijai užtenka net ir mažo baltymo kiekio branduolyje (Kretzschmar ir Clevers, 2017).

Pastebėta, kad esant aktyviam kanoniniam Wnt signaliniam keliui padidėja daugelio baltymų stabilumas. Taip nutinka, nes baltymų kinazė GSK3 $\beta$  negali disocijuoti iš destrukcijos komplekso ir fosforilinti kitų savo taikinių bei tokiu būdu sumažinti jų stabilumą. Manoma, kad visame ląstelės proteome net 20% baltymų stabilumas yra valdomas GSK3 $\beta$ . Sumažėjęs GSK3 $\beta$  taikinių skaidymas prisideda prie greitesnio vėžinių ląstelių augimo bei pasidalinimo (Zhan *et al.*, 2017; Rasmussen *et al.*, 2018).

**Wnt/JNK kelias.** WNT glikoproteinai įvairiais keliais gali skatinti JNK kinazių aktyvumą. Pirma, šis kelias gali būti aktyvuojamas WNT4/5A/11 glikoproteinams sąveikaujant su FZD receptoriais bei RYK, ROR2 bei PTK7 koreceptorais (Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018; Katoh ir Katoh, 2005b; Katoh ir Katoh, 2005a; Sedgwick ir D'Souza-Schorey, 2016). Ši sąveika lemia DVL pritraukimą ir fosforilinimą. Fosfo-DVL per savo DEP domeną pritraukia bei aktyvuoja RAC1 GTPazę, kuri skatina JNK aktyvumą (Komiya ir Habas, 2008). Ligando-receptorius sąveika JNK aktyvumą gali skatinti ir per RhoA (Gomez-Orte *et al.*, 2013; Sabatino *et al.*, 2014) bei CDC42 (Kikuchi *et al.*, 2009). Taip pat žinoma, kad nuo JNK priklausomas Wnt signalinis kelias gali būti aktyvuojamas WNT4/5A/11 sąveikos su ROR receptoriais metu. Toliau JNK kinazės fosforilina citoplazminius arba branduolyje esančius savo taikinius taip didindamos arba mažindamos jų aktyvumą. Manoma, kad Wnt/DVL/JNK kelias gali aktyvuoti apoptozę (Rasmussen *et al.*, 2018). Visgi, JNK poveikis ląstelėms priklauso nuo JNK aktyvacijos trukmės – trumpalaikė JNK aktyvacija skatina ląstelių išgyvenimą, o ilgalaikė – sukelia apoptozę (Ventura *et al.*, 2006).

**Wnt/Ca<sup>2+</sup> kelią** aktyvuoja WNT5A/11 sąveika su FZD2-7 dalyvaujant ROR1/2 koreceptoriams (De, 2011; Kuhl *et al.*, 2000; Grumolato *et al.*, 2010; Slusarski ir Pelegri, 2007). Ši ligando-receptorius sąveika pritraukia fosfo-DVL ir lemia fosfolipazės C aktyvaciją (PLC). Aktyvi PLC katalizuoja fosfatidilinozitolio 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) virsmą į inozitolio 1,4,5-trisfosfatą (IP<sub>3</sub>) ir 1,2-diacilglicerolį (DAG) (De, 2011). IP<sub>3</sub> skatina Ca<sup>2+</sup> jonų išėjimą iš endoplazminio tinklo. Tai aktyvuoja įvairius nuo Ca<sup>2+</sup> priklausomus baltymus, pavyzdžiui, nuo Ca<sup>2+</sup>/kalmodulino priklausomą baltymų kinazę II (CAMKII), TGF $\beta$  aktyvuojamą kinazę (TAK1), į Nemo panašią kinazę (NLK), kalcineurinę ir kitus (Rasmussen *et al.*, 2018; Deitrick ir Pruitt, 2016). Tuo tarpu DAG kartu su Ca<sup>2+</sup> aktyvuoja baltymų kinazę C (PKC). Toliau CAMKII ir PKC aktyvuoja transkripcijos veiksnius NF $\kappa$ B ir CREB, o

kalcineurinas – NFAT (De, 2011). Be to, pastebėta, kad NLK, CAMKII ir kalmodulinas slopina Wnt/ $\beta$ -katenino kelią (Komiya ir Habas, 2008; Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018).

**Wnt signalinio kelio reguliacija.** Wnt signalinis kelias gali būti valdomas ligandų ir receptorių lygiuose. Signalą perduodančių ląstelių endoplazminiame tinkle vyksta Wnt ligandų glikozilinimas bei konservatyvios serino liekanos modifikavimas palmitoleinatu, dalyvaujant palmitoleino transferazei porkupinui (Nile ir Hannoush, 2016). Taip modifikuotas WNT sąveikauja su transmembraniniu baltymu WLS, kuris lemia WNT baltymo nukreipimą į Goldžio kompleksą ir tolesnę pilnai subrendusio baltymo sekreciją į ląstelės išorę (Zhan *et al.*, 2017). Wnt ligandai gali būti: 1) išnešami iš ląstelės ant egzosomų paviršiaus (Gross *et al.*, 2012); 2) išmetami iš ląstelės kompleksu su lipoproteinais pavidalu (Herr *et al.*, 2012); 3) likti prisitvirtinę prie sekretuojančios ląstelės membranos (palmitoleinatu tarnaujant inkaru) (Port ir Basler, 2010). Po WNT sekrecijos WLS baltymas gražinamas į endoplazminį tinklą, kur jis gali sąveikauti su naujai subrendusiu Wnt ligandu (Kikuchi *et al.*, 2011).

Palmitoleinato liekanos prijungimas svarbus ne tik Wnt ligando sekrecijai, bet ir ligando sąveikai su receptoriu (Janda *et al.*, 2012). Nustatyta, kad baltymas NOTUM gali katalizuoti šios liekanos pašalinimą ir tokiu būdu slopinti Wnt signalinį kelią (Kakugawa *et al.*, 2015). Šis signalinis kelias taip pat slopinamas kitų su Wnt ligandais sąveikaujančių baltymų, tokių kaip WNT slopinantis veiksnys WIF1, sekretuojami su FZD receptoriais susiję baltymai sFRP1–5, Cerberus, TIKI, APCDD1 (Tortelote *et al.*, 2017; Kretzschmar ir Clevers, 2017).

Wnt ligandų ir receptorių sąveika slopinama su FZD receptoriais arba koreceptoriais sąveikaujančių baltymų SOST, APCDD1, Dickkopf1–4 (DKK1–4) (Tortelote *et al.*, 2017; Kretzschmar ir Clevers, 2017). DKK1/2 ne tik blokuoja ligando sąveiką su LRP, bet pritraukia transmembraninį baltymą KREMEN, kuris skatina LRP endocitozę (Krausova ir Korinek, 2014). Tuo tarpu NORRIN veikia kaip alternatyvus FZD ligandas ir esant LRP aktyvuoja nuo  $\beta$ -katenino priklausomą kelią (Junge *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2013).

Wnt signalas nutraukiamas neigiamo grįžtamojo ryšio –  $\beta$ -kateninas skatina ubikvitino ligazių ZNRF3 ir RNF43 raišką, kurios ubikvitilina FZD receptorius ir taip juos pašalina iš membranos. Šį procesą gali sutrikdyti sekretuojami baltymai R-spondinai sudarydami LGR5/R-spondinas/ZNRF3 arba LGR5/R-spondinas/RNF43 kompleksus ir tokiu būdu sustiprindami Wnt signalą (Tortelote *et al.*, 2017).

**Wnt signalinio kelio svarba kolorektalinio vėžio vystymesi.** Nuo  $\beta$ -katenino priklausomas Wnt signalinis kelias yra labai svarbus kolorektalinio vėžio vystymesi. Deitrick ir Pruitt su kolorektalinio vėžio atsiradimu sieja mutacijas APC ir KRAS baltymus koduojančiuose genuose. Dažniausiai aptinkamos APC geno mutacijos, kurios lemia nepilno ilgio baltymo susidarymą – net 85% navikų turi mutaciją bent viename APC alelyje, o 60% navikų – dviejuose. KRAS funkcijos įgijimo mutacijos leidžia šiam baltymui savitai fosforilinti su E-kadherinu sąveikaujantį  $\beta$ -kateniną ir tokiu būdu skatinti  $\beta$ -katenino atpalaidavimą bei pernašą į branduolį (Deitrick ir Pruitt, 2016). Kolorektaliniam vėžiui taip pat būdingos mutacijos  $\beta$ -katenino reguliaciniame domene (būdingos 5% vėžio atvejų) (Krausova ir Korinek, 2014), RNF43 funkcijos praradimo mutacijos (18% vėžio atvejų), translokacijos R-spondinus koduojančiuose genuose (8% atvejų) (Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018) ir kitos. Padidėjęs Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio aktyvumas taip pat gali prisidėti prie kepenų, gimdos kaklelio, kiaušidžių ir kitų audinių kancerogenezės (Su *et al.*, 2010). Tuo tarpu nekanoniniai Wnt signaliniai keliai priklausomai nuo vėžio tipo bei stadijos gali ir slopinti, ir skatinti vėžio atsiradimą (Humphries ir Mlodzik, 2018; Wang, 2009).

**Wnt signalinis kelias ir atsparumas chemoterapiniams vaistams.** Padidėjęs Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumas nesmulkialąstelinio plaučių vėžio atveju siejamas su atsparumu cisplatinai (Yang *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2013) ir taksoterui (Wang *et al.*, 2012), o kepenų vėžio atveju – su atsparumu interferono- $\alpha$  ir 5-FU deriniui (Noda *et al.*, 2009). Pastebėta, kad  $\beta$ -katenino baltymo kiekio padidėjimas lemia didesnę IAP4 raišką ir apoptozės slopinimą, tokiu būdu padidindamas kasos vėžio ląstelių atsparumą gemcitabinui (Guo *et al.*, 2009b). GSK3 $\beta$  aktyvumo padidėjimas II stadijos kolorektalinio vėžio navikuose siejamas su mažesniu 5-FU veiksmingumu (Grassilli *et al.*, 2013). Padidėję  $\beta$ -katenino ir JNK bei sumažėjęs CaMKII baltymo kiekis siejamas su padidėjusiu kiaušidžių vėžio ląstelių atsparumu cisplatinai (Huang *et al.*, 2016b). Kitame cisplatinai atsparių kiaušidžių vėžio ląstelių tyrime parodyta, kad ROR1 ir ROR2 yra svarbūs šių ląstelių migracijai ir invazyvumui (Henry *et al.*, 2016). Neigiamo Wnt signalinio kelio regulatoriaus DKK-1 lokalizacija branduolyje – vienas iš kolorektalinio vėžio atsparumo chemoterapiniams vaistams žymenų (Aguilera *et al.*, 2015).

**Wnt signalinio kelio aktyvumą keičiantys junginiai.** Wnt signalinio kelio slopikliai gali būti skirstomi pagal jų taikinius. WNT/FZD komplekso slopikliams priskiriami porkupino slopikliai (LGK974, ETC-159, IPW-2), su

Wnt ligandais (OMP-54F28, monokloniniai antikūnai atpažįstantys WNT1 arba WNT2, sFRP, WIF) bei su FZD receptoriais (OMP18R5, OTSA101, OMP131R10, FOXY-5, DKN-01) sąveikaujantys baltymai. Destrukcijos komplekso slopikliams priklauso AXIN stabilumą padidinantys tankirazių slopikliai (XAV939, IWR1, NVP-TNKS656, JW74, WIKI4) bei DVL slopikliai (NSC668036, J01-017a, FJ9, 3289-8625).  $\beta$ -katenino aktyvuojamų transkripcijos kompleksų slopikliai veikia kaip  $\beta$ -katenino/TCF antagonistai (PKF115-584, CGP049090, PKF118-310, iCRT3, iCRT5, iCRT14, PNU-74654, BC21, LF3) arba su  $\beta$ -kateninu sąveikaujančių transkripcijos aktyviklių antagonistai (ICG-001, PRI-724, NCB-0846) (Novellasdemunt *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2017; Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018; Haikarainen *et al.*, 2013). Taip pat žinomi ir Wnt signalinio kelio aktyvatoriai (BML-284, IM-12, AZD2858, CP21R7, SKL2001, WAY-316606, SB-216763, SB-415286) (Liu *et al.*, 2005; Schmole *et al.*, 2010; Marsell *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2010; Gwak *et al.*, 2012; Bodine *et al.*, 2009; Coghlan *et al.*, 2000).

### 1.3.2 Notch signalinis kelias

Notch signalinis kelias – tai ląstelių bendravimui svarbus konservatyvus ligando – receptoriaus signalinis kelias (Soltanian ir Matin, 2011; Wang *et al.*, 2010). Pagrindiniai šio signalinio kelio dalyviai – keturi Notch receptoriai (NOTCH1-4) bei penki ligandai, kurie priklauso DLL (DLL1/3/4) arba Jagged (JAG1/2) šeimoms (Li *et al.*, 2017).

NOTCH1-4 – vieną kartą membraną perveriantys heterodimeriniai baltymai, sudaryti iš dviejų fragmentų – užląstelinio fragmento NEC ir transmembraninio-viduląstelinio fragmento NTM (Ntziachristos *et al.*, 2014). NEC fragmente yra 29 – 36 į epidermio augimo veiksnį panašūs pasikartojimai EGFL, kurie svarbūs receptoriaus sąveikai su ligandu. Taip pat šiame fragmente yra neigiamoje reguliacijoje dalyvaujantis NRR regionas, kuris užtikrina signalinio kelio slopinimą nesant ligando (Kopan ir Ilagan, 2009). Tuo tarpu NTM sudarytas iš trumpo užląstelinio domeno (dalyvauja heterodimerizacijoje; jame yra S2 kirpimo sritis), transmembraninės dalies ir NOTCH viduląstelinio domeno (NICD). Svarbiausi NICD motyvai – su RBPJ $\kappa$  sąveikaujantis RAM domenas, ankirino pasikartojimai (ANK), dvi branduolio lokalizacijos sekos, transaktyvacijos domenas ir PEST seka (Sjoqvist ir Andersson, 2017). NOTCH1 ir NOTCH2 struktūra yra labai panaši. Tuo tarpu NOTCH3 ir NOTCH4 pasižymi mažesniu EGFL pasikartojimų kiekiu (atitinkamai 34 ir 29) bei neturi transaktyvacijos domeno (Sjoqvist ir Andersson, 2017; Ntziachristos *et al.*, 2014).

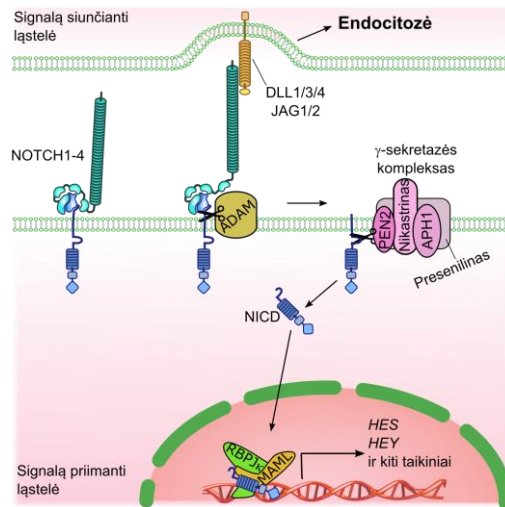


Notch receptorių pirmtakai sintetinami endoplazminiame tinkle kaip vienos polipeptidinės grandinės transmembraniniai baltymai. Čia prasideda šių pirmtakų brendimas: EGFL pasikartojimai modifikuojami O-gliukozės liekanomis dalyvaujant POGlut1 (ši modifikacija palengvina receptoriaus skėlimą) (Acar *et al.*, 2008), O-fukozės liekanomis dalyvaujant POFUT1 (Stahl *et al.*, 2008) bei O-N-acetilglikozamino liekanomis dalyvaujant EOGT1 (Sawaguchi *et al.*, 2017). Taip modifikuoti Notch receptorių pirmtakai pernešami į Goldžio kompleksą, kuriame N-acetilglikozaminas prijungiamas prie O-gliukozės dalyvaujant ksilosiltransferazėms (GXYLT1/2, XXYLT1) ir O-fukozės dalyvaujant Fringe šeimos baltymams (Lunatic, Radical arba Manic) (Kovall *et al.*, 2017; Moloney *et al.*, 2000; Takeuchi ir Haltiwanger, 2014). Nustatyta, kad Fringe šeimos baltymai modifikuoja skirtingus EGFL pasikartojimus ir tokiu būdu keičia receptoriaus afiniškumą ligandams. Pavyzdžiui, Radical skatina NOTCH1 sąveiką su DLL1 ir JAG1 ligandais, kai tuo tarpu Lunatic ir Manic skatina sąveiką su DLL1/4, o sąveiką su JAG1/2 slopina (Siebel ir Lendahl, 2017; Sjöqvist ir Andersson, 2017). Notch receptorių pirmtakų brendimas baigiamas trans-Goldžio komplekse vykstant jų skėlimui S1 srityje, kurį vykdo furino tipo konvertazė (Blaumueller *et al.*, 1997). Tokiu būdu susidaro du Notch receptoriaus fragmentai, kurie iškart dimerizuojasi dalyvaujant  $Ca^{2+}$ . Subrendęs heterodimerinis baltymas pūslelių pagalba pernešamas į ląstelės plazminę membraną (Li *et al.*, 2017).

DLL1/3/4 ir JAG1/2 – vieną kartą ląstelės membraną perveriantys baltymai, kurių svarbiausi motyvai: užląstelinėje srityje esantis DSL domenas, daug EGFL pasikartojimų turintis domenas (dalyvauja ligando-receptoriaus sąveikoje), transmembraninė sritis bei viduląstelinis PDZ motyvus turintis domenas (dalyvauja sąveikoje su kitais ląstelės baltymais) (Sjöqvist ir Andersson, 2017). JAG baltymai turi daugiau EGFL pasikartojimų negu DLL baltymai (atitinkamai 16 ir 6–8). Be to, jiems būdingas cisteinu turtingas domenas, kurio neturi DLL (Colliton *et al.*, 2001; Kangsamaksin *et al.*, 2015; UniProtKB). Kaip ir Notch receptoriai, ligandai yra modifikuojami signalą siunčiančių ląstelių Goldžio komplekse dalyvaujant Fringe baltymams. Nustatyta, kad DLL1/3 glikozilinimas dalyvaujant Lunatic skatina šių baltymų *cis* sąveiką su NOTCH1 (Sjöqvist ir Andersson, 2017).

**Kanoninis Notch signalinis kelias** aktyvuojamas subrendusiam Notch receptoriui sąveikaujant su kitos ląstelės paviršiuje esančiu Notch ligandu (1.5 pav.). Šios sąveikos metu ligandą pateikiančioje ląstelėje aktyvuojamos ubikvitino E3 ligazės MINDBOMB, NEURALIZED (ubikvitilina DLL1/4 ir

JAG1 (Koo *et al.*, 2007; Koutelou *et al.*, 2008)) arba SKELETROPHIN (ubikvitilina JAG2 (Takeuchi *et al.*, 2005)), kurios monoubikvitilina Notch ligandų viduląstelinę dalį. Tai skatina receptoriaus NEC domeno-ligando komplekso endocitozę į ligandą pateikiančią ląstelę. Endocitozė čia sukuria mechaninę jėgą, kuri atidengia ląstelės išorėje esančią ADAM10/17 metaloproteazės jautrią Notch receptoriaus sritį (S2 sritis) (Kovall *et al.*, 2017; Bray ir Gomez-Lamarca, 2018; Kopan ir Ilagan, 2009). Po vienos iš šių proteazių vykdomo kirpimo susidaręs NEXT (angl. *Notch extracellular truncated*) toliau sąveikauja su  $\gamma$ -sekretazės kompleksu, kuris vykdo receptoriaus kirpimą S3 srityje tokiu būdu leidamas transkripcijos aktyviui NICD keliauti į branduolį (Kopan ir Ilagan, 2009). Kur vyksta S3 kirpimas dar nėra tiksliai žinoma – vieni tyrimai rodo, kad po S2 kirpimo NEXT endocituojamas ir S3 kirpimas vyksta endosomose (Windler ir Bilder, 2010; Gupta-Rossi *et al.*, 2004), kiti teigia, kad šis kirpimas vyksta prie ląstelės plazminės membranos ir nuo endocitozės nepriklauso (Sorensen ir Conner, 2010; Struhl ir Adachi, 2000). Taip pat pastebėta, kad  $\gamma$ -sekretazės kirpimo metu gali susidaryti skirtingą stabilumą turintys NICD produktai. Pavyzdžiui, N-gale valiną turintis NICD1 yra stabilus, o seriną arba leuciną – greitai suskaidomas (Tagami *et al.*, 2008).



**1.5 pav. Kanoninis Notch signalinis kelias.** Pagal (Kovall *et al.*, 2017; Bray ir Gomez-Lamarca, 2018; Kopan ir Ilagan, 2009)

NICD į branduolį patenka kanoniniu nuo  $\alpha/\beta 1$  importinų priklausomu keliu (Huenniger *et al.*, 2010). Branduolyje NICD per RAM ir ANK domenus sąveikauja su transkripcijos veiksniu RBPJk susidarant NICD-RBPJk kompleksui. NICD ir RBPJk sąveikos paviršiuje susiformuoja

griovelis, per kurį prie komplekso prisijungia transkripcijos aktyviklis MAML (MAML1-3) (Bray ir Gomez-Lamarca, 2018). NICD-RBPJk-MAML kompleksas pritraukia transkripcijai svarbius veiksnius (p300, CBP, PCAF, PBAF, BRG1, PB1, PHF8, aF4p12, Zmiz1, NACK, LSD1, PRC2, AIB1, BRD4, MED1, RNF40) ir, priklausomai nuo konteksto, aktyvuoja arba slopina NOTCH genų-taikinių raišką (1.3 lentelė) (Siebel ir Lendahl, 2017; Weaver *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2017; Mo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

**1.3 lentelė. Notch signalinio kelio aktyvuojamų ir slopinamų genų pavyzdžiai**

Receptorius	Valdomi genai
NOTCH1	<b>Aktyvuoja:</b> <i>HES1</i> (Iso <i>et al.</i> , 2002), <i>HES5</i> (Sweeney <i>et al.</i> , 2004), <i>HEY1</i> , <i>HEY2</i> , <i>HEYL</i> (de Celis ir Bray, 2000), <i>DELTEX1</i> (Palomero <i>et al.</i> , 2006), <i>NFKB2</i> (Oswald <i>et al.</i> , 1998), <i>PLXND1</i> (Rehman <i>et al.</i> , 2016), <i>ABCB1</i> (Wu <i>et al.</i> , 2014), <i>ABCC1</i> (Li <i>et al.</i> , 2016; Cho <i>et al.</i> , 2011), <i>ABCG2</i> (Bhattacharya <i>et al.</i> , 2007), <i>SOX9</i> (Haller <i>et al.</i> , 2012), <i>CCND1</i> (Cohen <i>et al.</i> , 2010a), <i>CDKN1A</i> , <i>CDK2</i> (Guo <i>et al.</i> , 2009a), <i>CDCA7</i> (Guiu <i>et al.</i> , 2014), <i>BCL2L3</i> (Palaga <i>et al.</i> , 2013), <i>IAP4</i> (Chen <i>et al.</i> , 2011), <i>PTEN</i> (Whelan <i>et al.</i> , 2007), <i>MYC</i> (Weng <i>et al.</i> , 2006), <i>SEPT4</i> (Liu, 2012) <b>Slopina:</b> <i>SERPINE1</i> (Yu <i>et al.</i> , 2016b), <i>CDKN2A</i> , <i>KLF4</i> (Han <i>et al.</i> , 2017; Ai <i>et al.</i> , 2014)
NOTCH2	<b>Aktyvuoja:</b> <i>HES1</i> , <i>HES5</i> (Shimizu <i>et al.</i> , 2002), <i>HEY1</i> , <i>HEY2</i> , <i>HEYL</i> (de Celis ir Bray, 2000), <i>IKKA</i> , <i>NFKB1</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>GSK3B</i> , <i>RASGRP2</i> , <i>MDM2</i> , <i>BAX</i> , <i>FOXO1</i> (Liu <i>et al.</i> , 2017), <i>TNC</i> (Sivasankaran <i>et al.</i> , 2009)
NOTCH3	<b>Aktyvuoja:</b> <i>HES1</i> , <i>HES5</i> (Sweeney <i>et al.</i> , 2004), <i>HES2</i> , <i>HES6</i> (Jaskula-Sztul <i>et al.</i> , 2015), <i>HEY1</i> , <i>HEY2</i> , <i>HEYL</i> (de Celis ir Bray, 2000), <i>BCL2</i> , <i>BIRC5</i> , <i>CFLAR</i> (Baeten ir Lilly, 2015), <i>PLXND1</i> (Rehman <i>et al.</i> , 2016), <i>CCND1</i> (Cohen <i>et al.</i> , 2010a), <i>PBX1</i> (Park <i>et al.</i> , 2008)

**Nekanoniniai Notch signaliniai keliai** gali būti skirstomi į keletą skirtingų tipų priklausomai nuo to kokie kanoninio Notch signalinio kelio elementai juose dalyvauja arba nedalyvauja. Pirmam tipui priskiriami signaliniai keliai, kuriuos aktyvuoja alternatyvūs ligandai. Pavyzdžiui, transmembraninių baltymų DNER, NB3, kontaktino 1, Jedi, DLK1 arba sekretuojamų baltymų MAGP1-2, NovH, YB1 sąveika su Notch receptoriumi aktyvuoja Notch signalinį kelią (D'Souza *et al.*, 2008; Rauen *et al.*, 2009; Siebel ir Lendahl, 2017). Antrasis tipas – RBPJk nepriklausomi, nuo NICD priklausomi keliai. Pavyzdžiui, citoplazmoje esantis NICD gali slopinti BAX oligomerizaciją ir tokiu būdu ląsteles apsaugoti nuo apoptozės (Perumalsamy *et al.*, 2010). NICD taip pat gali sudaryti kompleksą su FIH-1 ir taip neleisti jam slopinti HIF1 $\alpha$  (Poellinger ir Lendahl, 2008). Tuo tarpu NICD sąveika su p50 arba c-REL aktyvuoja NF $\kappa$ B (Pan *et al.*, 2017). Be to, nustatyta, kad NICD gali veikti kaip LEF1 aktyviklis (Ross ir Kadesch, 2001). Trečiasis tipas – nuo RBPJk priklausomi, nuo NICD nepriklausomi keliai. Pavyzdžiui, su Kaposi sarkoma susijusio herpes viruso baltymo RTA

(Liang *et al.*, 2002), Epstein-Barr viruso baltymo EBNA2 (Zimmer-Strobl *et al.*, 1994), adeno viruso baltymo 13SE1A (Ansieau *et al.*, 2001) sąveika su RBPJK lemia šio baltymo konformacijos pokyčius bei transkripcijos aktyviklių pritraukimą.

**Ląstelių sąlyčio plotas.** Pastebėta, kad kuo didesnis ląstelių sąlyčio plotas, tuo į branduolį perduodamas signalas bus stipresnis ir ilgiau išliekantis (Shaya *et al.*, 2017; Bray, 2016). Be to didesnis sąlyčio plotas galimai sukuria didesnius receptoriaus kirpimui reikalingus energijos kiekius. NOTCH1 yra kerpamas sunkiausiai ir tam reikalingas didžiausias ląstelių sąlyčio plotas (Bray, 2016). Antroje vietoje pagal kirpimui reikalingą energiją – NOTCH2 (Sjoqvist ir Andersson, 2017). Tuo tarpu NOTCH3 yra kerpamas lengviausiai (Xu *et al.*, 2015). Jo kirpimui užtenka ligando pateikimo filopodijomis (Sugiyama *et al.*, 2010; Cohen *et al.*, 2010b) arba endosomomis (Boelens *et al.*, 2014; Sheldon *et al.*, 2010; Sharghi-Namini *et al.*, 2014). Kadangi NOTCH3 kirpimui reikia mažiausiai energijos, jo kirpimas gali vykti ir sąveikaujant su tirpiaisi ligandais (Rauen *et al.*, 2009) arba nepriklausomai nuo ligando (Choy *et al.*, 2017). Pasak James *et al.* NOTCH4 kirpimas *in vitro* ląstelių kultūrose nevyksta (James *et al.*, 2014).

**Cis sąveika.** Ląstelėje tuo pačiu metu gali vykti ir Notch receptorių, ir ligandų sintezė. Ligando ir receptoriaus *cis* sąveika (t.y. kai ligandas sąveikauja su toje pačioje ląstelėje esančiu receptoriumi) negali aktyvuoti Notch signalinio kelio, nes nesusidaro S2 kirpimui reikiamos jėgos. Be to, ši sąveika neleidžia receptoriui sąveikauti su *trans* pateikiamu ligandu (t.y. kitoje ląstelėje esančiu ligandu) ir Notch signalinis kelias slopinamas (Kovall *et al.*, 2017; D'Souza *et al.*, 2008). Pastebėta, kad daugiau ligandų negu Notch receptorių turinti ląstelė siųs signalą kitai ląstelei. Tuo tarpu daugiau Notch receptorių negu ligandų turinti ląstelė signalą priims (Bray, 2016). Kai kurie autoriai teigia, kad DLL3 ir NOTCH4 dalyvauja tik *cis*-slopinime (Serth *et al.*, 2015; Ladi *et al.*, 2005; James *et al.*, 2014).

**Notch signalinio kelio reguliacija.** Neigiamoje Notch signalinio kelio reguliacijoje dalyvauja Notch receptorių arba ligandų ubikvitilinimą skatinantys baltymai (NUMB, NUMBL, Itch, DELTEX1-2) (McGill ir McGlade, 2003; Garcia-Heredia ir Carnero, 2018; Zhang *et al.*, 2010b; Shao *et al.*, 2017) bei NICD sąveiką su RBPJK arba aktyviklių pritraukimą slopinantys baltymai (Aes, Emerin, RITA, DELTEX1) (Sonoshita *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017; Wacker *et al.*, 2011; Izon *et al.*, 2002). Teigiamai Notch signalinio kelio aktyvumą veikia su Notch receptoriais sąveikaujantys AAK1 (Gupta-Rossi *et al.*, 2011), MDM2 (Pettersson *et al.*, 2013) bei NUMB transliaciją arba veikimą slopinantys MUTASH1-2 (Imai *et al.*,

2001; Kudinov *et al.*, 2017), nPKC $\iota$  (Mah *et al.*, 2015). Šio signalinio kelio valdyme svarbų vaidmenį taip pat atleika potransliacinės NICD modifikacijos, kurios keičia NICD aktyvumą arba stabilumą (Bray, 2016). Viena svarbiausių NICD potransliacinių modifikacijų – fosforilinimas. CDK8 arba GSK3 $\beta$  katalizuojamas NICD PEST domeno fosforilinimas lemia ubiquitino E3 ligazės SEL10 pritraukimą ir NICD suskaidymą (Bray ir Gomez-Lamarca, 2018; Bray, 2016). NLK, DYRK1A ir kazeino kinazė CK2 fosforilina NICD bei tokiu būdu slopina MAML prisijungimą prie NICD-RBPJ $\kappa$  komplekso (Ishitani *et al.*, 2010; Fernandez-Martinez *et al.*, 2009; Ranganathan *et al.*, 2011). Tuo tarpu branduolio lokalizacijos sekų fosforilinimas dalyvaujant GSK3 $\beta$  arba PIM padidina NICD pernašą į branduolį ir teigiamai veikia Notch signalinio kelio aktyvumą (Han *et al.*, 2012; Santio *et al.*, 2016). Kitos žinomos NICD potransliacinės modifikacijos: acetilinimas dalyvaujant p300, PCAF, KAT5 (Popko-Scibor *et al.*, 2011; Palermo *et al.*, 2012; Collesi *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2007); deacetilinimas dalyvaujant SIRT1 (Guarani *et al.*, 2011; Bai *et al.*, 2018; Collesi *et al.*, 2018); metilinimas dalyvaujant CARM (Hein *et al.*, 2015); deubikvitilinimas dalyvaujant USP28 (Taranets *et al.*, 2015; Diefenbacher *et al.*, 2014; Diefenbacher *et al.*, 2015); sumoilinimas (Antila *et al.*, 2018).

**$\gamma$ -sekretazės kompleksą** sudaro pamatinis komplekso baltymas APH1, katalitinį aktyvumą turintis presenilinas 1 arba 2, komplekso stabilumą padidinantis nikastrinas ir presenilino veikimą sustiprinantis PEN2 (Kovall *et al.*, 2017). Pagrindiniai šio komplekso kerpami substratai – vieną kartą membraną perveriantys baltymai tokie kaip NOTCH1-4, Notch ligandai (LaVoie ir Selkoe, 2003), ląstelių adhezijoje dalyvaujantys baltymai (pavyzdžiui, E-kadherinas, EpCam (Jurisch-Yaksi *et al.*, 2013), N-kadherinas (Uemura *et al.*, 2006), Desmoglein-2 (Hemming *et al.*, 2008)), receptoriai (pavyzdžiui, IFNaR2 (El Fiky *et al.*, 2005), IL1R1 (Elzinga *et al.*, 2009), IL1R2 (Kuhn *et al.*, 2007), IL6R (Chalaris *et al.*, 2010), LRP6 (Mi ir Johnson, 2007), NRADD (Gowrishankar *et al.*, 2004), VEGFR1 (Cai *et al.*, 2006)) ir kiti baltymai.  $\gamma$ -sekretazės kompleksas nėra savitas konkrečioms transmembraninių baltymų sekoms, o jo vykdomas kirpimas priklauso nuo po kirpimo likusio užląstelinio domeno dydžio – kuo mažesnis likęs užląstelinis domenas, tuo kirpimas efektyvesnis (Jurisch-Yaksi *et al.*, 2013). Ne visi ląstelėje esantys  $\gamma$ -sekretazės kompleksai yra aktyvūs. Pastebėta, kad HIF1 $\alpha$  prisijungimas gali aktyvuoti šiuos kompleksus ir skatinti NOTCH kirpimą (Villa *et al.*, 2014). Šio komplekso aktyvumo padidėjimą gali lemti padidėjęs presenilino kiekis (Li *et al.*, 2011), o aktyvumo sumažėjimas gali

būti siejamas su taškinėmis presenilino stabilumą sumažinančiomis mutacijomis (To *et al.*, 2006; Mumm *et al.*, 2000).

**HES1** – transkripcijos veiksnys, kuris gali veikti kaip transkripcijos aktyvatorius (aktyvuoja *DBF4* (Wu ir Lee, 2002)), aktyvus arba pasyvus represorius (slopina *E2F1* (Hartman *et al.*, 2004), *ASCL1* (Grynfeld *et al.*, 2000), *CD4* (Allen *et al.*, 2001), *MAP2* (Maddodi *et al.*, 2010), *PTEN* (Palomero *et al.*, 2008), *PTGDS* (Fujimori *et al.*, 2005), *Math*, *neurogenin* (Liu *et al.*, 2015b)) arba veikti kitais būdais. Aktyvios represijos atveju HES1 per WRPW domeną sudaro kompleksą su TLE represoriais. Susidaręs HES1/TLE kompleksas jungiasi su DNR N dėžutėmis, prie kurių pritraukiamos histonų deacetilazės. Be to žinoma, kad histonų deacetilazės HES1 gali pritaukti ir tiesiogiai per bHLH domenų. Pasyvios represijos atveju HES1 per bHLH domeną jungiasi prie kito transkripcijos veiksnio tokiu būdu sudarydamas prie DNR negalintį prisijungti heterodimerą ir slopindamas šio transkripcijos veiksnio aktyvumą (Liu *et al.*, 2015b). Taip pat žinoma, kad susidaręs HES1/pRb heterodimeras sąveikauja su RUNX2 baltymu ir aktyvuoja nuo RUNX2 priklausomų genų raišką (Lee *et al.*, 2006). Be to, HES1 gali prisijungti prie STAT3 ir skatinti jo fosforilinimą (Kamakura *et al.*, 2004). *HES1* raišką gali indukuoti ne tik Notch signalinis kelias, bet ir hipoksija, Wnt, Hedgehog, BMP/TGFβ signaliniai keliai (Borggreffe *et al.*, 2016).

**Notch ir Wnt signalinių kelių sąsajos.** Nustatyta, kad Wnt ir Notch signaliniai keliai įvairiais būdais veikia vienas kitą (Collu *et al.*, 2014). Pirma, veikia kartu valdydami tam tikrų genų raišką. Pavyzdžiui, branduolyje β-kateninas gali sudaryti kompleksą su NICD-RBPJK ir aktyvuoti arterijų formavimuisi svarbių genų raišką, tačiau esant aktyviam tik Wnt arba tik Notch signaliniam keliui ši raiška neaktyvuojama (Yamamizu *et al.*, 2010). Antra, vieno signalinio kelio aktyvuojami genai veikia kitą signalinį kelią. Pavyzdžiui, nuo β-katenino priklausomas Wnt signalinis kelias skatina Notch signalinį kelią aktyvuojančio ligando *JAG1* ir receptoriaus *NOTCH2* raišką (Ungerback *et al.*, 2011; Rodilla *et al.*, 2009). Tuo tarpu NICD skatina *FZD* receptorių raišką (Collu *et al.*, 2014). Trečia, tiesioginė sąveika, kurios metu vienas signalinis kelias slopina arba skatina kitą signalinį kelią. Pavyzdžiui, β-katenino sąveika su NOTCH1 skatina Notch signalinį kelią – sumažėja NOTCH1 ubikvitilimas ir padidėja NOTCH1 taikinio *HES1* raiška (Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018). Tuo tarpu nuo β-katenino priklausomas signalinis kelias slopinamas – β-katenino-NOTCH sąveika skatina β-katenino endocitozę ir suskaidymą lizosomose (Collu *et al.*, 2014). Visgi, neseniai kolorektalinės karcinomos

ląstelėse buvo parodyta, kad NICD1 gali skatinti  $\beta$ -katenino pernašą į branduolį bei TCF promotoriaus aktyvaciją (Ishiguro *et al.*, 2017). Taip pat pastebėta, kad GSK3 $\beta$  fosforilina NICD. Šios kinazės vykdomas NICD1 fosforilinimas lemia NICD1 pernašą į branduolį, padidina jo aktyvumą ir stabilumą (Krishnamurthy ir Kurzrock, 2018). Kita vertus, GSK3 $\beta$  vykdomas NICD2 fosforilinimas nekeičia NICD2 stabilumo, bet sumažina jo aktyvumą (Espinosa *et al.*, 2003).

**Notch signalinio kelio svarba kolorektalinio vėžio vystymesi.** Priklausomai nuo audinio, vėžio ląstelių tipo ir mikroaplinkos Notch signalinis kelias gali skatinti arba slopinti vėžio vystymąsi (Li *et al.*, 2017). Kai kurie tyrimai rodo, kad šis signalinis kelias yra svarbus žmogaus kolorektalinio vėžio iniciacijoje – adenomoms bei ankstyvoms vėžio stadijoms būdingas didelis Notch signalinio kelio aktyvumas, o pažengusio ir metastazinio vėžio atvejams – mažas aktyvumas (Szarynska *et al.*, 2017). Tuo tarpu kiti tyrimai rodo, kad *NOTCH1* koduojančio geno kopijų ir iRNR raiškos padidėjimas kolorektaliniuose navikuose susijęs su vėlesne vėžio stadija, intensyvesne ląstelių proliferacija, apoptozės slopinimu ir agresyvesniu naviko fenotipu (Zhang *et al.*, 2010a; Arcaroli *et al.*, 2016; Chu *et al.*, 2011). Be to, Zheng *et al.* atlikta imunohistocheminė kolorektalinio vėžio pacientų navikų analizė parodė, kad šiam vėžiniui audiniui būdinga ne tik padidėję *NOTCH1*, bet ir *JAG1*, NF $\kappa$ B ir *MMP9* baltymų kiekiai (Zheng *et al.*, 2015). Agresyvesnis kolorektalinio vėžio fenotipas taip pat siejamas su sumažėjusiu *NOTCH2* (Wang *et al.*, 2013; Masuda, 2011; Chu *et al.*, 2009) bei padidėjusiais *NOTCH3* (Ozawa *et al.*, 2014; Serafin *et al.*, 2011), *JAG1* (Sugiyama *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2011), *JAG2* (Vaish *et al.*, 2017; He *et al.*, 2016) baltymų kiekiais. Be to, *NOTCH* stabilumą padidinanti deubikvitinazė *USP28* skatina kolorektalinio vėžio vystymąsi (Diefenbacher *et al.*, 2014).

*HES1* svarba kolorektalinio vėžio kancerogenezėje nėra vienareikšmė – kai kurie tyrimai rodo, kad mažesnis branduolinio *HES1* baltymo lygis susijęs su prastesniu pacientų išgyvenamumu (Ahadi *et al.*, 2016), kiti teigia priešingai ir su agresyvesniu fenotipu sieja didesnę *HES1* baltymo kiekį (Yuan *et al.*, 2015a). Pastaruoju atveju naviko agresyvumo padidėjimas galėtų būti paaiškinamas tuo, kad *HES1* skatina su kamieniškumu siejamų genų *CD133*, *ABCG2*, *NANOG*, *ALDH1* raišką tokiu būdu padidindamas kolorektalinio vėžio ląstelių gebą atsinaujinti (Gao *et al.*, 2014). Be to, *HES1* aktyvuoja *BMI-1* ir *PTEN/AKT/GSK3 $\beta$*  kelią ir tokiu būdu skatina ląstelių proliferaciją bei migraciją (Gao *et al.*, 2015).

### **Notch signalinis kelias ir atsparumas chemoterapiniams vaistams.**

Padidėję Notch receptorių baltymo kiekiai dažnai siejami su atsparumu chemoterapiniams vaistams: NOTCH1 – plaučių ir prostatos vėžio atsparumu taksoterui (Huang *et al.*, 2016a; Wang *et al.*, 2017b), plaučių ir krūties vėžio atsparumu doksorubicinui (Hassan *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015), glioblastomos ląstelių atsparumu 5-FU, OxaPt, cisplatinai (Yu *et al.*, 2016a); NOTCH2 – kepenų vėžio ląstelių atsparumu 5-FU (Capodanno *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2016a); NOTCH3 – plaučių vėžio atsparumu taksoterui (He *et al.*, 2017), urotelio ir kiaušidžių vėžio atsparumu cisplatinai (Zhang *et al.*, 2017b; McAuliffe *et al.*, 2012), kiaušidžių vėžio atsparumu karboplatinai (Gupta *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2010). Pastebėta, kad aktyvus Notch signalinis kelias gali lemti ABCC1 lygio padidėjimą bei slopinti nuo p53 priklausomą apoptozę (Kim *et al.*, 2015; Stylianou *et al.*, 2006). Kaip teigia Mungamuri *et al.* ši apoptozės slopinimą NICD1 gali vykdyti per nuo PI3K/AKT/PKB, mTOR ir eIF4E priklausomą kelią sutrikdydamas p53 fosforilinimą bei pernašą į branduolį (Mungamuri *et al.*, 2006).

Su vėžio ląstelių atsparumo chemoterapiniams vaistams padidėjimu taip pat gali būti siejami ir padidėję Notch ligandų kiekiai: JAG1 ir DLL4 – su krūties ir kiaušidžių vėžio ląstelių atsparumu taksoterui (Steg *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017a); JAG2 – kolorektalinio vėžio atsparumu doksorubicinui (Vaish *et al.*, 2017). Taip pat žinoma, kad HES1 baltymo kiekio padidėjimas kepenų ir kolorektalinio vėžio atveju susijęs su atsparumu 5-FU (Capodanno *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2017b) bei kepenų vėžio atsparumu gemcitabinui (Cao *et al.*, 2015). Tai gali vykti dėl HES1 skatinamo epitelio-mezenchimos virsmo bei *ABCB1*, *ABCC1* ir *ABCC2* raiškos (Sun *et al.*, 2017b). Neigiamo Notch signalinio kelio reguliatoriaus NUMBL lygio sumažinimas naudojant shRNR padidina HeLa ląstelių atsparumą irinotekanui, 5-FU, gemcitabinui ir taksoterui (Garcia-Heredia *et al.*, 2016). Tuo tarpu NUMB gali sudaryti kompleksą su p53 ir MDM2, tokiu būdu sumažindamas p53 ubikvitilinimą ir suskaidymą (Colaluca *et al.*, 2008).

**Notch signalinio kelio aktyvumą keičiantys junginiai.** Notch signalinio kelio slopinimui naudojami  $\gamma$ -sekretazės slopikliai (RO4929097, DAPT, LY-3039478, LY-450139, LY-411575, LY-900009, BMS-299897, BMS-708163, BMS-906024, PF-03084014, MK-0752, GSI-18, GSI-136, GSI-953, MRK003), ADAM slopikliai (TAPI-1, GI254023X, INCB7839, XL784), ligando receptoriaus sąveiką slopinantys junginiai (tirpus NOTCH1 ektodomenas, NOTCH1-EGF11-13-Fc, DLL4-Fc, DLK1, N110-24, N11-13, monokloniniai antikūnai saviti NOTCH1 OMP52M51, NOTCH2/3 OMP-59R5, DLL4 OMP21M18, YW152F, REGN421, REGN1035) bei



transkripcijos komplekso slopikliai (IMR1, SAHM1) (Tamagnone *et al.*, 2018; Venkatesh *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2015b; Kumar *et al.*, 2016).

#### 1.4 Autofagija

Autofagija – tai procesas, kurio metu dalis citoplazmos yra nukreipiama suskaidymui lizosomose (Galluzzi *et al.*, 2017a). Priklausomai nuo suskaidomų medžiagų ir jų patekimo į lizosomas būdo išskiriami trys autofagijos tipai: nuo šaperonų priklausoma autofagija, mikroautofagija ir makroautofagija (Li *et al.*, 2012). Nuo šaperonų priklausomai autofagijai būdingas tiesioginis KFERQ motyvus turinčių citoplazminių baltymų patekimas į lizosomų vidų dalyvaujant HSPA8 ir LAMP2A baltymams. Tuo tarpu mikroautofagijos metu įlinksta lizosomų membrana ir į jų vidų įtraukiami įvairesni substratai. Iš visų autofagijos tipų geriausiai apibūdinta makroautofagija (toliau vadinama autofagija) – dvisluoksnei membranai apsupus organeles bei dalį citoplazmos susidaro autofagosomos, kurioms susiliejus su lizosomomis – autolizosomos (Galluzzi *et al.*, 2017a).

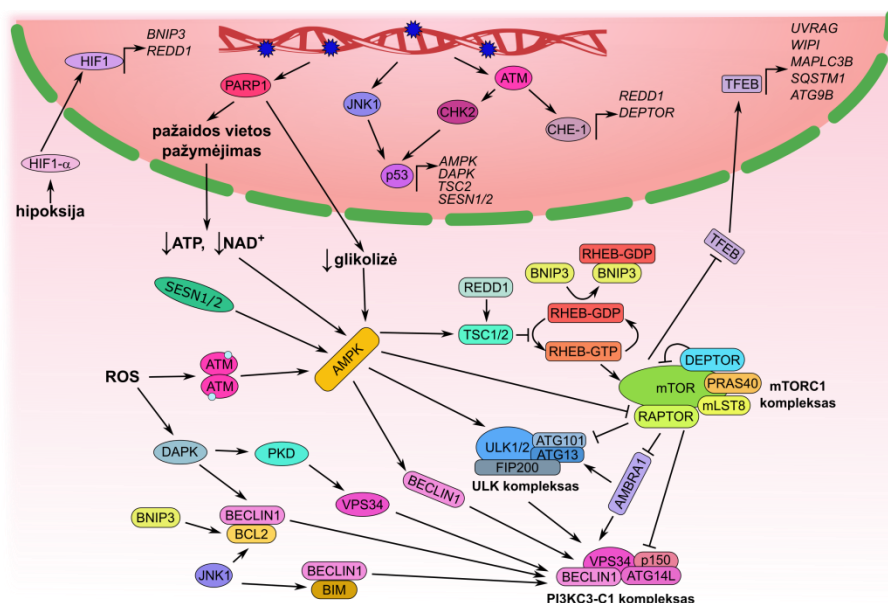
Autofagija dalyvauja ląstelės homeostazės palaikyme. Daugumai ląstelių būdinga konstitutyvi bazinė autofagija, kurios metu pašalinami ilgai gyvuojantys baltymai, baltymų agregatai bei senos prasčiau veikiančios organelės (Lippai ir Szatmari, 2017; Yin *et al.*, 2016; La Rovere *et al.*, 2016). Manoma, kad ląstelės augimui palankiomis sąlygomis bazinė autofagija katabolizuoja apie 1 – 1,5% ląstelės baltymų per valandą (Simon *et al.*, 2017).

Ląstelės geba labai greitai reaguoti į stresą ir padidinti autofagijos intensyvumą (Lippai ir Szatmari, 2017). Tai užtikrinama ląstelėje nuolat sintetinant baltymus, kurie sudaro autofagijos indukcijai ir izoliuojančių membranų augimui svarbius kompleksus ULK1/2-ATG13-ATG101-FIP200 (ULK kompleksas) ir VPS34-p150-BECLIN1-ATG14L (PI3KC3-C1 kompleksas). Ląstelės augimui palankiomis sąlygomis šių kompleksų aktyvumas slopinamas: 1) mTOR-RAPTOR-mLST8-PRAS40-DEPTOR kompleksas (mTORC1 kompleksas) per RAPTOR baltymą sąveikauja su ULK kompleksu ir fosforilina ULK1/2 bei ATG13 (Antonioli *et al.*, 2017; Chandra *et al.*, 2016; Mercer *et al.*, 2018); 2) PI3KC3-C1 kompleksas negali susidaryti, nes BECLIN1 yra surišamas susidarant jo kompleksams su BCL2, BCLxL, MCL1 arba BIM baltymu (Antonioli *et al.*, 2017). Taip pat žinoma, kad mTORC1 kompleksas fosforilina TFEB ir tokiu būdu skatina šio transkripcijos veiksnio sąveiką su 14-3-3 baltymais bei sulaikymą

**1.4 lentelė. Autofagijos indukcijai svarbių streso aktyvuojamų baltymų pavyzdžiai**

Baltymai	Stresas	Mechanizmai
TSC1/2	DNR pažaidos, ROS, hipoksija, augimo veiksnių, ATP, aminorūgščių trūkumas	Aktyvus TSC1/2 skatina mTORC1 komplekso veikimui reikalingo RHEB-GTP virsmą į RHEB-GDP, todėl mTORC1 kompleksas slopinamas (Simon <i>et al.</i> , 2017; Chandra <i>et al.</i> , 2016).
AMPK	ATP trūkumas, hipoksija, ROS, DNR pažaidos	Aktyvi AMPK fosforilina: 1) ULK1/2 bei TSC2, tokiu būdu padidina jų aktyvumą (Pietrocola <i>et al.</i> , 2013; Paquette <i>et al.</i> , 2018); 2) RAPTOR ir taip slopina mTORC1 kompleksą (Chandra <i>et al.</i> , 2016); 3) BECLIN1, tokiu būdu skatina PI3KC3-C1 komplekso susirinkimą ir pritraukimą prie izoliuojančių membranų (Chandra <i>et al.</i> , 2016; Antonioli <i>et al.</i> , 2017).
AMBRA1	Maisto medžiagų trūkumas	Kai yra maisto medžiagų, mTORC1 fosforilina ir slopina AMBRA1. Trūkstant maisto medžiagų AMBRA1 defosforilinamas ir skatina nuo TRAF6 priklausomą ULK bei nuo CULLIN4 priklausomą PI3KC3-C1 komplekso ubikvitilinimą. Tai padidina šių kompleksų stabilumą ir skatina autofagiją (Zachari ir Ganley, 2017).
HIF1	Hipoksija	Esant hipoksijai mažėja HIF1 $\alpha$ skaidymas. HIF1 skatina <i>BNIP3</i> , <i>REDD1</i> raišką. BNIP3 sąveikauja su: 1) RHEB ir slopina mTOR (Paquette <i>et al.</i> , 2018); 2) BCL2 bei skatina BCL2-BECLIN1 komplekso disociaciją ir BECLIN1 įjungimą į PI3KC3-C1 kompleksą (Lippai ir Sztamari, 2017). REDD1 slopina TSC2 sąveiką su 14-3-3 baltymais ir taip skatina TSC2 aktyvumą (Tan ir Miyamoto, 2016).
PARP1	DNR trūkiai	Prie DNR trūkių jungiasi PARP1, kuri naudodama NAD <sup>+</sup> poli-ADP-ribozilina baltymus ir tokiu būdu pažymi DNR pažaidos vietą. Taip pat poli-ADP-ribozilina heksokinazė ir slopinama glikolizė. Esant daug pažaidų labai sumažėja NAD <sup>+</sup> bei ATP kiekiai, o tai aktyvuoja AMPK (Dianov, 2011; Simon <i>et al.</i> , 2017; Eliopoulos <i>et al.</i> , 2016).
ATM	DNR trūkiai, ROS, hipoksija	Dvigrandinių DNR trūkių vietose prie DNR galų prisijungia MRN kompleksas, kuris skatina ATM autofosforilinimą ir aktyvaciją. p-ATM: 1) fosforilina CHK2, kuris fosforilina ir aktyvuoja p53; 2) aktyvuoja su RNR polimeraze II sąveikaujantį baltymą CHE-1, kuris skatina mTOR slopinančių baltymų <i>REDD1</i> ir <i>DEPTOR</i> raišką (Eliopoulos <i>et al.</i> , 2016; Simon <i>et al.</i> , 2017). ROS oksiduoja citoplazmoje esantį ATM ir skatina jo dimerizaciją. Šis ATM dimeras aktyvuoja AMPK (Eliopoulos <i>et al.</i> , 2016).
JNK1	Maisto medžiagų trūkumas, DNR pažaidos	Esant maisto medžiagų trūkumui fosforilina BCL2 bei BIM, todėl suyra BCL2-BECLIN1 arba BIM-BECLIN1 kompleksai (Bento <i>et al.</i> , 2016). Esant genotoksiniam stresui fosforilina ir stabilizuoja p53 (Chandra <i>et al.</i> , 2016; Zachari ir Ganley, 2017).
p53	DNR pažaidos	Aktyvus p53 skatina <i>AMPK</i> , <i>TSC2</i> , <i>DAPK</i> , <i>SESN1/2</i> raišką (Simon <i>et al.</i> , 2017; Eliopoulos <i>et al.</i> , 2016; Feng <i>et al.</i> , 2007; Mrakovcic ir Frohlich, 2018). SESN1/2 baltymai aktyvuoja AMPK (Simon <i>et al.</i> , 2017).
DAPK	ROS, endoplazminio tinklo stresas	Aktyvi DAPK: 1) fosforilina BECLIN1 ir taip skatina BCL2-BECLIN1 komplekso disociaciją (Antonioli <i>et al.</i> , 2017); 2) aktyvuoja PKD, kuri fosforilina VPS34 ir taip skatina autofagosomų formavimąsi (Lippai ir Sztamari, 2017).

citoplazmoje (Paquette *et al.*, 2018; Chandra *et al.*, 2016; Fullgrabe *et al.*, 2016). Kai mTORC1 kompleksas slopinamas, vyksta TFEB defosforilinimas ir migracija į branduolį, kur jis skatina autofagijai svarbių (pavyzdžiui, *UVRAG*, *WIPI*, *MAPLC3B*, *SQSTM1*, *VPS11*, *VPS18*, *ATG9B*) bei lizosomų biogenezei svarbių genų (pavyzdžiui, lizosomų hidrolazes koduojančių genų *ASAHI*, *GAA*, *GBA*, *GLA*, *GLB1*, *IFI30*, *PLBD2*, *SCPEP1*, *TPP1*; lizosomų membraninius baltymus koduojančių genų *CTNS*, *CLN3*, *MCOLN1*, *LAMP1*) raišką (Settembre *et al.*, 2011; Palmieri *et al.*, 2011). Kai kurie mechanizmai, kuriais ląstelės stresas aktyvuoja ULK ir PI3KC3-C1 kompleksus apžvelgti 1.4 lentelėje ir grafiškai pavaizduoti 1.6 pav.



**1.6 pav. Autofagijos indukcija.** Pagal (Simon *et al.*, 2017; Chandra *et al.*, 2016; Fullgrabe *et al.*, 2016; Pietrocola *et al.*, 2013; Paquette *et al.*, 2018; Antonioli *et al.*, 2017; Zachari ir Ganley, 2017; Lippai ir Szatmari, 2017; Tan ir Miyamoto, 2016; Dianov, 2011; Eliopoulos *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2007; Mrakovcic ir Frohlich, 2018; Bento *et al.*, 2016)

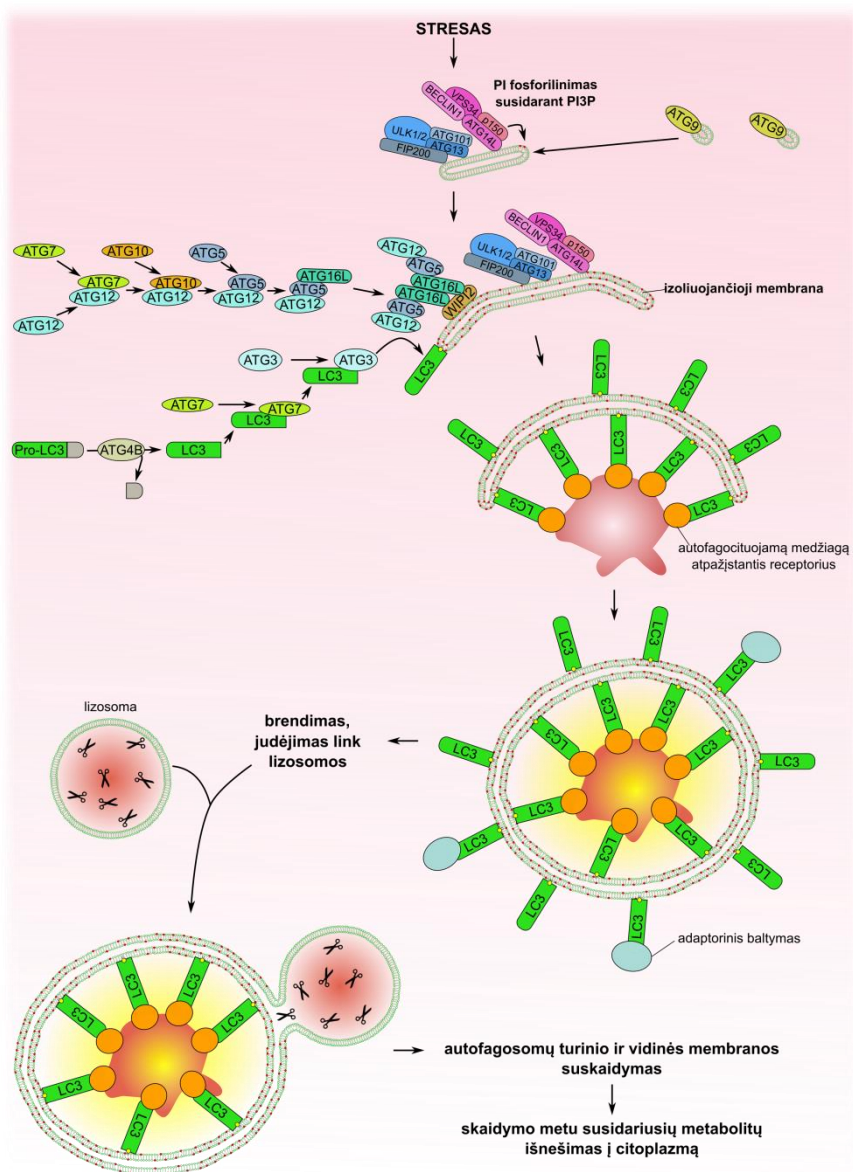
**Autofagosomų formavimasis ir brendimas.** Streso signalai lemia mTORC1-ULK disociaciją, po kurios vyksta ULK komplekso autofosforilinimas, aktyvacija bei lokalizacija į vietas, kuriose prasideda izoliuojančių membranų formavimasis (1.7 pav.). Šiuo metu manoma, kad izoliuojančių membranų lipidai gali būti kilę iš plazminės, endoplazminio tinklo, Goldžio komplekso, mitochondrijų arba endosomų membranų (Dikic ir Elazar, 2018; Kruppa *et al.*, 2016). Aktyvus ULK kompleksas toliau fosforilina daugybę taikinių, pavyzdžiui: 1) kartu su SRC fosforilina transmembraninį baltymą ATG9 ir skatina ATG9 turinčių pūslelių pritraukimą į autofagijos iniciacijos sritis; 2) AMBRA1, taip sumažina

PI3KC3-C1 komplekso sąveiką su ląstelės citoskeletu ir galimai skatina šio komplekso translokaciją prie izoliuojančių membranų; 3) BECLIN1, ATG14L ir skatina PI3KC3-C1 komplekso aktyvumą; 4) p62 ir skatina selektyvią autofagiją (Zachari ir Ganley, 2017; Mercer *et al.*, 2018).

Aktyviam PI3KC3-C1 kompleksui fosforilinant izoliuojančiose membranose esantį fosfatidilinozitolį susidaro fosfatidilinozitolio 3-fosfatas (PI3P) (Mercer *et al.*, 2018). Susidarius PI3P sankauptoms membrana išlinksta bei pritraukiami su PI3P sąveikaujantys baltymai DFCP1, ALFY (skatina baltymų agregatams selektyvią autofagiją), WIPI1-4 (skatina izoliuojančių membranų augimui svarbių kitų baltymų pritraukimą; pavyzdžiui, per WIPI4 pritraukiamas ATG2A, o per WIPI2 pritraukiamas ATG16L1 kompleksas su ATG5-ATG12 konjugatu bei ATG3 ir ATG7 baltymai) (Mercer *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2016; Molino *et al.*, 2017).

Izoliuojančių membranų augimui reikia dviejų konjugacinių sistemų. Pirmoji vykdo ATG12 konjugaciją – ATG12 C galo glicino karboksigrupę aktyvinama dalyvaujant ATP ir susidarant tioesteriniui ryšiui su ATG7 cisteinu. Nuo ATG7 cisteino ATG12 yra pernešamas ant ATG10 cisteino, kol galiausiai per izopeptidinį ryšį ATG12 prijungiamas prie ATG5 lizino (Nakatogawa, 2013). Antroji konjugacinė sistema vykdo LC3/GABARAP (LC3A-C, GABARAP, GABARAPL1-2) baltymų prijungimą prie izoliuojančios membranos fostatildiletanolamino (PE) (Lippai ir Szatmari, 2017; Martens *et al.*, 2016; Mercer *et al.*, 2018). Prieš konjugaciją pro-LC3 baltymai yra kerpami cisteino proteazės ATG4B tokiu būdu susidarant LC3-I formai, kurios C gale yra glicinas (Tsapras ir Nezis, 2017). Šio glicino karboksigrupę aktyvina ATG7, kuris perneša LC3-I ant ATG3, kol galiausiai dalyvaujant ATG5-ATG12 konjugato ir ATG16L1 kompleksui LC3-I sudaro amidinį ryšį su PE (Nakatogawa, 2013; Antonioli *et al.*, 2017). Tokiu būdu LC3-PE (toliau vadinamas LC3-II forma) prijungiamas prie abiejų izoliuojančios membranos pusių ir manoma gali veikti izoliuojančios membranos tolimesnį augimą ir autofagosomos užsidarymą (Mercer *et al.*, 2018; Lippai ir Szatmari, 2017). LC3-II taip pat labai svarbus autofagijos selektyvumui – prie jo jungiasi įvairūs autofagijos receptoriai, pavyzdžiui: 1) p62 sąveikauja su ubikvitilintais substratais ir skatina baltymų agregatų, nukleorūgščių, tarpinių kūnelių bei bakterijų autofagiją; 2) NDP52 – mitochondrijų ir nukleorūgščių autofagiją; 3) FAM134B – endoplazminio tinklo autofagiją (Khaminets *et al.*, 2016).

Autofagosomoms užsidarius toliau vyksta jų brendimas – prie išorinės membranos pusės pritraukiami autofagosomų judėjimui link lizosomų



**1.7 pav. Autofagosomų formavimasis ir brendimas.** Pagal (Simon *et al.*, 2017; Dikic ir Elazar, 2018; Lippai ir Sztamari, 2017; Tsapras ir Nezis, 2017; Bento *et al.*, 2016)

(FYCO1, RAB7, RIPL) bei autofagosomų susiliejimui su lizosomomis svarbūs baltymai (STX17, SNAP29, PLEKHM1, VPS34-p150-BECLIN1-UVRAG kompleksas) (Dikic ir Elazar, 2018; Lippai ir Sztamari, 2017; Antonioli *et al.*, 2017). Manoma, kad kai kurie susiliejimui su lizosomomis svarbūs baltymai gali atkelti iš ankstyvųjų ir/arba vėlyvųjų endosomų – šioms susiliejus su autofagosomomis ir susidarius hibridinėms pūslėlėms

amfisomoms (Lippai ir Szatmari, 2017). Taip pat pastebėta, kad autofagosomų brendimo metu ATG4B katalizuoja LC3-II pašalinimą nuo išorinės membranos pusės (Tsapras ir Nezis, 2017). Visgi, nesutariama kuriame tiksliai autofagosomų brendimo etape tai vyksta.

Galiausiai įvyksta autofagosomų/amfisomų išorinės membranos susiliejimas su lizosomomis susidarant autolizosomoms. Čia lizosomų hidrolazės suskaido vidinę autofagosomų membraną bei autofagosomų turinį. Skaidymo metu susidarę metabolitai permeazių pagalba grąžinami į citoplazmą (Lippai ir Szatmari, 2017; Kruppa *et al.*, 2016). Kadangi prie vidinės autofagosomų membranos pusės prijungtas LC3-II formos baltymas suskaidomas tik po susiliejimo su lizosomomis, šis baltymas dažnai naudojamas kaip autofaginių membranų/autofagosomų žymuo.

**Autofagija ir Wnt signalinis kelias.** Atlikus bioinformatinę su autofagija susijusių kinazių analizę pastebėta, kad dauguma jų susiję su  $Ca^{2+}$  signalu, Wnt bei mTOR signaliniais keliais (Yang *et al.*, 2014b). 2010 metais Gao *et al.* parodė, kad autofagija neigiamai reguliuoja Wnt signalinį kelią – trūkstant maisto medžiagų pVHL ubikvitilintas DVL2 baltymas sąveikauja su autofagijos adaptoriniu baltymu p62, per kurį DVL2 įtraukiamas į autofagosomas bei suskaidomas šioms susiliejus su lizosomomis (Gao *et al.*, 2010). Be to, nustatyta, kad Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimas glioblastomos ląstelėse lemia p62 lygio ir autofagijos srauto padidėjimą (Nager *et al.*, 2018). Vienas iš būdų kaip Wnt signalinis kelias gali veikti autofagiją yra nuo GSK3 priklausomas mTORC1 komplekso aktyvumo reguliavimas, kuris priklausomai nuo ląstelių tipo bei konteksto gali būti teigiamas (Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2015; Karyo *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2011) arba neigiamas (Inoki *et al.*, 2006; Gulen *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009a; Suzuki *et al.*, 2013). Pavyzdžiui, Azoulay-Alfaguter *et al.* nustatė, kad GSK3 raiškos padidėjimas MCF-7 ląstelėse skatina mTORC1 aktyvaciją bei nuo mTORC1 nepriklausomą autofagijos srauto ir lizosomų rūgštumo sumažėjimą (Azoulay-Alfaguter *et al.*, 2015). Tuo tarpu Inoki *et al.* teigia, kad nesant Wnt signalo, GSK3 $\beta$  gali fosforilinti TSC2 ir tokiu būdu slopinti mTORC1 (Inoki *et al.*, 2006).

**Autofagija ir Notch signalinis kelias.** Autofagija slopina Notch signalinį kelią keliais būdais – nuo ATG16L1 priklausomu keliu suskaido nekirtus Notch receptorių (Wu *et al.*, 2016b) bei lemia citoplazminio NICD suskaidymą nuo p62 priklausomu keliu (Jia *et al.*, 2014). ATG4A gali turėti ir nuo autofagijos nepriklausomų funkcijų – skrandžio vėžio ląstelėse skatina HES1 raiškos padidėjimą ir epitelio-mezenchimos virsmą (Yang *et al.*, 2016b). Tuo tarpu NOTCH/NICD gali teigiamai arba neigiamai veikti

autofagiją. T<sub>reg</sub> ląstelėse pastebėta, kad NICD1 gali sudaryti kompleksus su BECLIN1 bei ATG14 ir tokiu būdu skatinti autofagiją (Sarin ir Marcel, 2017). Plaučių vėžio ląstelėse NOTCH3 nutildymas siRNR sumažina LC3-II baltymo lygį (Ma *et al.*, 2016). Panašūs rezultatai stebimi ir podocituose, kur Notch signalinio kelio slopinimas  $\gamma$ -sekretazės slopikliu DAPT slopina autofagiją (Zhang *et al.*, 2017a). Tuo tarpu gliomos ląstelėse NOTCH1 siejamas su autofagijos slopinimu nuo STAT3, AKT ir mTOR priklausomais keliais (Zou *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Čia NOTCH1 raiškos sumažinimas shRNR padidina LC3-II ir BECLIN1 baltymų lygius (Yao *et al.*, 2015). Panašios tendencijos stebimos ir glioblastomos ląstelėse, kur Notch signalinio kelio slopinimas  $\gamma$ -sekretazės slopikliu MRK003 siejamas su LC3-II baltymo lygio padidėjimu, o autofagijos slopinimas CQ – su MRK003 citotoksiškumo padidėjimu (Natsumeda *et al.*, 2016). Taip pat pastebėta, kad *presenilino 1* delecija arba su paveldima Alzheimerio liga susijusios jo mutacijos slopina autofagiją sutrikdydamos lizosomų rūgštėjimą (Duggan ir McCarthy, 2016).

**Autofagijos svarba kolorektalinio vėžio vystymesi.** Priklausomai nuo vėžio stadijos autofagija slopina arba skatina naviko vystymąsi. Ankstyvose vėžio stadijose autofagija apsaugo ląsteles nuo vėžinės transformacijos – užtikrina genomo stabilumą, pašalina pažeistas organeles, baltymų agregatus, onkogenus, sukelia nuo onkogenų priklausomą ląstelės senėjimą ir žūtį (Burada *et al.*, 2015; Galluzzi *et al.*, 2015). Tuo tarpu vėlesnėse vėžio stadijose autofagija skatina naviko augimą – padidina ląstelių atsparumą hipoksijai, maisto medžiagų trūkumui bei terapijai (Galluzzi *et al.*, 2015). Padidėjęs LC3-II baltymo kiekis siejamas su kolorektalinio vėžio agresyvumu ir mažesniu jautrumu terapijai. Be to, su mažesniais šansais išgyventi siejama padidėjęs ATG10 baltymo kiekis, ATG5 mutacijos arba sumažėjęs baltymo kiekis (Burada *et al.*, 2015; Marinkovic *et al.*, 2018).

**Autofagija ir atsparumas chemoterapiniams vaistams.** Autofagijos slopinimas padidina vėžinių ląstelių jautrumą terapijai: 1) ATG7 arba BECLIN1 siRNR – stemplės vėžio ląstelių jautrumą 5-FU (O'Donovan *et al.*, 2011); 2) CQ – endometriumo vėžio ląstelių jautrumą cisplatinai (Fukuda *et al.*, 2015); 3) HCQ – neuroblastomos jautrumą doksorubicinui ir vinkristinui (Belounis *et al.*, 2016); 4) BECLIN1 siRNR arba CQ – kolorektalinio vėžio ląstelių jautrumą OxaPt (Selvakumaran *et al.*, 2013). Taip pat žinoma, kad padidėjęs BECLIN1 baltymo kiekis kolorektalinių karcinomų atveju siejamas su mažesniu 5-FU efektyvumu ir prastesniu pacientų išgyvenamumu (Park *et al.*, 2013).

**Autofagijos modulatoriai.** Autofagijos slopinimui gali būti naudojami AMPK slopikliai (dorsomorphin), ULK1 slopikliai (SBI-0206965, MRT68921, MRT67307), lizosomų funkcijas sutrikdantys junginiai (CQ, HCQ, BafA1, Lys05), ATG4B slopikliai (NSC185058). Autofagijos indukcijai dažniausiai naudojami mTORC slopikliai (RAD-001, rapamicinas, CCI-779) arba AMPK aktyvikliai (metforminas) (Galluzzi *et al.*, 2017b; Bhat *et al.*, 2018).



## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Gaminamų buferių sudėtis

**PBS** – buferinis druskų tirpalas (pH 7,3), kuriame yra 171,1 mM NaCl, 3,35 mM KCl, 1,84 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ir 10,14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Ruošiamas ddH<sub>2</sub>O. Autoklavuojamas.

**DPBS** – buferinis druskų tirpalas (pH 7,3), kuriame yra 136,9 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,9 mM CaCl<sub>2</sub> ir 0,83 mM MgSO<sub>4</sub>. Ruošiamas ddH<sub>2</sub>O. Autoklavuojamas.

**EDTA tirpalas** – 0,985 mM EDTA (Sigma) tirpalas PBS buferyje.

**Tripsino tirpalas** – iš kiaulių kasos išskirtas tripsinas (Sigma) ištirpintas EDTA tirpale (0,5 mg/mL).

**RIPA** – ląstelių lizės buferis: 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% natrio deoksicholato, 0,1% NDS, 1% Triton X-100, peptidazių slopiklių mišinio (Sigma).

**NDS elektroforezės buferis:** 24,76 mM Tris (Roth), 191,8 mM glicino (Roth), 3,47 mM NDS.

**Pusiausauso pernešimo buferis:** 48 mM Tris (Roth), 39 mM glicino (Roth), 1,3 mM NDS, 15% izopropanolio.

**TBS/T buferis:** 50 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 (Roth).

### 2.2 Ląstelių linijos

HCT116 (ATCC® CCL-247<sup>TM</sup>) – žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelių linija, kuri inicijuota iš Dukes' D stadijos pirminio naviko. Šios linijos ląstelės auga prisitvirtinusios prie augimo indo paviršiaus, pasižymi epiteline morfologija bei priskiriamos CMS1 kolorektalinio vėžio subtipui (Frejno *et al.*, 2017; Linnekamp *et al.*, 2018). Ląstelių genomui būdingas mikrosatelitų nestabilumas, aukštas promotorių CpG salų metilinimo laipsnis, *BRAF*<sup>wt</sup>, *KRAS*<sup>wt/G13D</sup>, *PIK3CA*<sup>wt/H1047R</sup>, *PTEN*<sup>wt</sup>, *TP53*<sup>wt</sup> (Ahmed *et al.*, 2013).

HCT116/FU ląstelių sublinija išvesta iš HCT116 ląstelių jas kultivuojant terpėje turinčioje 5-FU bei pamažu didinant šio vaisto koncentraciją (nuo 10 μM iki 100 μM) metus laiko, kol ląstelės įgijo stabilų atsparumą 5-FU. HCT116/OXA ląstelių sublinija išvesta iš HCT116 ląstelių jas kultivuojant terpėje turinčioje OxaPt ir pamažu didinant šio vaisto koncentraciją (nuo 1 μM iki 20 μM) 9 mėnesius, kol ląstelės įgijo stabilų atsparumą OxaPt.

Šios ląstelių linijos kultivuojamos RPMI 1640 terpėje (Biochrom AG), turinčioje 10% negimusio veršelio serumo (NVS) (Biochrom AG), 2 mM

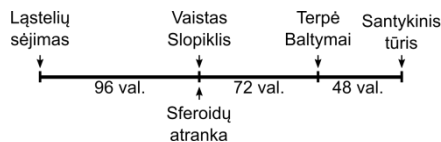


24 val. prieš vaisto pridėjimą; 30  $\mu$ M CQ 4 val. iki baltymų surinkimo (autofagijos srauto įvertinimui). Ląstelių gyvybingumas vertinamas KV arba MTT metodais praėjus 48 val. po poveikio vaistu. Ląstelės surenkamos genų raiškos vertinimui praėjus 24 val., o baltymų raiškos vertinimui – praėjus 48 val. po 5-FU arba OxaPt poveikio (eksperimentų schemos pateikti 2.1 pav.).

#### 2.4.2 Daugialąstelių sferoidų eksperimentai

Daugialąstelių sferoidų iniciacijai ląstelės sėjamos į plokščiadugnes 96 šulinėlinių plokšteles (TPP), kurių dugnas padengtas steriliu 1,4% agarozės (Sigma) tirpalu RPMI 1640 terpėje be NVS. Eksperimentams ląstelės sėjamos šiais tankiais: HCT116 – 3750 ląstelių/mL, HCT116/FU – 4750 ląstelių/mL, HCT116/OXA – 4250 ląstelių/mL. Į šulinėlį pilama po 200  $\mu$ L ląstelių suspensijos. Užsėjus plokštelę centrifuguojama 1000 $\times$ g 15 min, kambario temperatūroje. Ląstelės nesėjamos į 96 šulinėlių plokštelės A ir H eilutes bei 1 ir 12 stulpelius. Šie šulinėliai užpildomi steriliu dH<sub>2</sub>O tokiu būdu sukuriant „vandens barjerą“, kuris apsaugo eksperimentams naudojamus šulinėlius nuo terpės nugaravimo (šulinėlių padengimo salygos ir ląstelių sėjimo tankiai optimizuoti pagal (Friedrich *et al.*, 2009)).

Praėjus 96 val. po ląstelių sėjimo susiformavę sferoidai fotografuojami naudojant invertuotą mikroskopą Nikon ECLIPSE TS100, turintį Lumenera's INFINITY1-1M kamerą. Sferoidų tūris įvertinamas nuotraukas apdorojant SpheroidSizer programa, parašyta MATLAB programinei įrangai (Chen *et al.*, 2014). Eksperimentams pasirenkami tik taisyklingos formos sferoidai (Zanoni *et al.*, 2016), kurių tūris  $0,0210 \pm 0,0012 \text{ mm}^3$ .



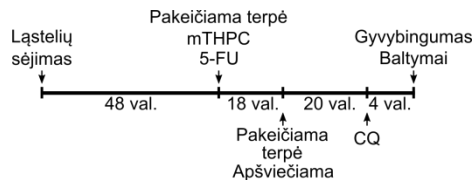
**2.2 pav. Sferoidų inkubacijos su chemoterapiniais vaistais eksperimentų schema.** Slopiklių dozės: 1 arba 5  $\mu$ M XAV, 1  $\mu$ M RO.

Eksperimentams atrinktuose šulinėliuose iškart pakeičiama pusė ląstelių kultivavimo terpės: kontroliniams sferoidams atsargiai užpilama po 100  $\mu$ L šviežios RPMI terpės su 10% NVS; 5-FU arba OxaPt paveikiamiems sferoidams – po 100  $\mu$ L terpės turinčios tokius vaistų kiekius, kad galutinė koncentracija šulinėlyje būtų 1 – 30  $\mu$ M 5-FU arba 0,6 – 30  $\mu$ M OxaPt. Kai nurodyta, ant sferoido užpilamoje terpėje būna toks slopiklio kiekis, kad galutinė slopiklio koncentracija šulinėlyje būtų 1  $\mu$ M RO; 1 arba 5  $\mu$ M XAV. Praėjus 72 val. po vaisto pridėjimo pakeičiama pusė šulinėlyje

esančios terpės arba sferoidai surenkami baltymo raiškos vertinimui. Praėjus 120 val. po vaisto pridėjimo įvertinami santykiniai sferoidų tūriai (eksperimento schema pateikta 2.2 pav.).

## 2.5 Ląstelių inkubacija su mTHPC

Ląstelės eksperimentams užsėjamos į 6 šulinėlių plokšteles bei lėkšteles, kurių auginimo paviršius yra 9,2 arba 22,1 cm<sup>2</sup> (TPP). HCT116 ląstelės sėjamos 1,5×10<sup>5</sup> ląstelių/mL, o HCT116/FU ląstelės – 3,0×10<sup>5</sup> ląstelių/mL tankiu. Praėjus 48 val. po ląstelių užsėjimo nusiurbiamas ląstelių kultivavimo terpė, o NVS likučiai pašalinami ląsteles 1× praplaunant PBS tirpalu. Tada ant ląstelių užpilama RMPI 1640 terpė (be NVS), kurioje yra 0,03 – 1 µg/mL mTHPC. Kai tiriamas mTHPC derinys su 5-FU poveikis, į 0,1 µg/mL mTHPC turinčią RPMI 1640 terpę be NVS papildomai pridedamas atitinkamas 5-FU kiekis (HCT116 ląstelėms 0,01 – 0,5 mM; HCT116/FU ląstelėms 0,1 – 10 mM). Ląstelės su mTHPC inkubuojamos 18 val. jas saugant nuo šviesos. Tada mTHPC turinti terpė nusiurbiamas, o į ląstelių vidų nepatekęs mTHPC pašalinamas ląsteles 1× atsargiai praplovus PBS tirpalu. Po to užpilama šviežia RPMI 1640 terpė su 10% NVS ir ląstelės 30 – 270 s apšviečiamos diodiniu šviesos šaltiniu UNIMELA-1, kurio  $\lambda = 660 \pm 5$  nm, o šviesos intensyvumas ląstelių lygyje 16 W/m<sup>2</sup>. Praėjus 24 val. po ląstelių apšvietimo vertinamas ląstelių gyvybingumas dažant KV arba ląstelės surenkamos baltymų skyrimui (eksperimento schema pateikta 2.3 pav.).



**2.3 pav. Ląstelių inkubacijos su mTHPC eksperimentų schema.** 4 val. prieš surenkant baltymus dalis ląstelių paveikiamos 30 µM CQ.

## 2.6 Ląstelių transfekcija siRNR

Ląstelės siRNR transfekcijai sėjamos: ląstelių gyvybingumo vertinimui – į 48 šulinėlių (Thermo Scientific) arba 96 šulinėlių juodas/skaidrias (Falcon) plokšteles; transfekcijos efektyvumo vertinimui – į 24 arba 12 šulinėlių plokšteles (Thermo Scientific). Ląstelės sėjamos antibiotikų neturinčioje RPMI 1640 terpėje su 10% NVS 2.1 lentelėje pateiktais tankiais. Praėjus 24 val. po ląstelių užsėjimo ląstelės transfekuojamos į norimą transkriptą nutaikytą siRNR.

**2.1 lentelė. Ląstelių sėjimo tankiai siRNR transfekcijos eksperimentams**

Ląstelių linija	Ląstelių sėjimo tankis sėjant į	
	0,75 – 3,8 cm <sup>2</sup> šulinėlius	0,32 cm <sup>2</sup> šulinėlius
HCT116	1,5×10 <sup>5</sup> ląstelių/mL	3000 ląstelių/šulinėliui
HCT116/FU	2,5×10 <sup>5</sup> ląstelių/mL	6000 ląstelių/šulinėliui
HCT116/OXA	2,0×10 <sup>5</sup> ląstelių/mL	4500 ląstelių/šulinėliui

**HES1 transkriptui savitos siRNR transfekcija.** Kai siekiama sumažinti HES1 baltymo raišką, ląstelės transfekuojamos *HES1* transkriptui savita siRNR (HES1 siRNR) arba siRNR, kuri nesavita jokiam žmogaus transkriptui (NT siRNR) (2.2 lentelė). Transfekcijos mišiniai paruošiami švelniai sumaišant 20 µL Opti-MEM terpėje (Thermo Fisher Scientific) praskiestos 3,6 pmol siRNR su 20 µL Opti-MEM terpėje praskiesto 0,6 µL Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific). Inkubuojama 15 min kambario temperatūroje ir sulašinama po 40 µL į 0,75 cm<sup>2</sup> auginimo ploto šulinėlį.

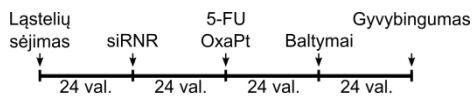
**ATG7 transkriptui savitos siRNR transfekcija.** Kai siekiama sumažinti ATG7 baltymo raišką, ląstelės transfekuojamos *ATG7* transkriptui savita siRNR (ATG7 siRNR) arba siRNR, kuri nesavita jokiam žmogaus transkriptui (NT siRNR) (2.2 lentelė). Transfekcijos mišiniai paruošiami švelniai sumaišant 5 µL Opti-MEM terpėje praskiestos 0,5 pmol siRNR su 5 µL Opti-MEM terpėje praskiesto 0,15 µL Lipofectamine® RNAiMAX. Inkubuojama 15 min kambario temperatūroje ir sulašinama po 10 µL į 0,32 cm<sup>2</sup> auginimo ploto šulinėlį.

**2.2 lentelė. Transfekcijai naudotų siRNR sekos**

siRNR	GeneBank	Seka
NK siRNR	-	5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUGUU(dTdT)-3'
HES1 siRNR	Y07572.1	5'-CCACGUGCGAGGGCGUUA(dTdT)-3'
ATG7 siRNR	NM_006395.2, NM_001136031.2, NM_001144912.1, NM_001349232.1, NM_001349233.1, NM_001349234.1, NM_001349235.1, NM_001349236.1, NM_001349237.1, NM_001349238.1	5'-GGAGUCACAGCUCUCCUUUU(dTdT)-3'

Praėjus 24 val. po ląstelių transfekcijos pakeičiama ląstelių kultivavimo terpė ir pridodama 5-FU (0,1 mM HCT116 ląstelėms; 1 mM HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms) arba OxaPt (0,03 mM HCT116 ir HCT116/FU ląstelėms; 0,3 mM HCT116/OXA ląstelėms). siRNR transfekcijos poveikis tikslinio baltymo kiekiui vertinamas po transfekcijos praėjus 48 val. Ląstelių

gyvybingumas vertinamas KV, MTT arba CTB metodu praėjus 48 val. po vaisto pridėjimo (eksperimento schema pateikta 2.4 pav.).



2.4 pav. Ląstelių transfekcijos su siRNR eksperimentų schema.

## 2.7 Ląstelių gyvybingumo testai

### 2.7.1 Dažymas kristaliniu violetiniu (KV)

Metodas pagrįstas kristalinio violetinio (N-[4-[bis[4-(dimetilamino)-fenil]metilen]-2,5-cikloheksadien-1-ilidin]-N-metilmetanamino chlorido) dažo prisijungimu prie baltymų. Atšokusios negyvybingos ląstelės atsargiai nuplaunamos PBS arba 0,9% NaCl tirpalu. Likusios prie auginimo indo paviršiaus prikibusios ląstelės 10 min. fiksuojamos 96% etanoliu. Užfiksuotos ląstelės dažomos 0,05% kristalinio violetinio tirpalu 20% etanolyje. Po 30 min. prie baltymų neprisijungęs dažas pašalinamas ląsteles 5–8× atsargiai praplaunant vandeniu. Prie baltymų prisijungęs dažas ištirpinamas 0,1% acto rūgšties tirpale 50% etanolyje. Spektrofotometru Asys UVM340 matuojama 8× praskiesto dažo sugertis  $A_{585}$ . Kontrolinių ląstelių sugerties vidurkis prilyginamas 100% gyvybingumui, o ląstelių gyvybingumas po poveikio išreiškiamas procentais nuo kontrolinių ląstelių.

### 2.7.2 MTT metodas

Metodas pagrįstas mitochondrijų oksidoreduktazių aktyvumo matavimu. Jis įvertinamas pagal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromido (MTT; Sigma) redukcijos metu susidariusio violetinės spalvos produkto 1-(4,5-dimetiltiazol)-3,5-difenilformazano kiekį. Ląstelės 1× praplaunamos DPBS tirpalu ir inkubuojamos su 0,1 mg/mL MTT tirpalu DPBS buferyje 1 val. +37°C. Nusiurbus MTT tirpalą, gyvybingose ląstelėse susidaręs violetinis MTT redukcijos produktas eliuojamas izopropanoliu. Spektrofotometru Asys UVM340 matuojama tirpalo, kurį sudaro 7 dalys ištirpinto dažo ir 3 dalys izopropanolio, sugertis  $A_{570}$ . Kontrolinių ląstelių sugerties vidurkis prilyginamas 100% gyvybingumui, o ląstelių gyvybingumas po poveikio išreiškiamas procentais nuo kontrolinių ląstelių.

### 2.7.3 CTB metodas

Metodas pagrįstas metaboliškai aktyviose ląstelėse vykstančia resazurino (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-ono 10-oksido) redukcija į fluorescuojantį produktą resorufiną (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-oną). Ląstelės auginamos

fluorescencijos matavimui tinkamose 96 šulinėlių juodose/skaidriose (Falcon) plokštelėse. Ląstelių gyvybingumo vertinimo metu į šulinėlius pridedama tiek CellTiter-Blue® (CTB, Promega) reagento, kad šio reagento ir ląstelių kultivavimo terpės santykis būtų 1:5. Su CTB ląstelės inkubuojamos 1 val. +37°C. Susidariusio resorufino fluorescencija sužadinama  $\lambda_{\text{suž.}}=560$  nm, matuojama  $\lambda_{\text{em.}}=590$  nm fluorimetru Varioskan Flash. Kontrolinių ląstelių fluorescencijos vidurkis prilyginamas 100% gyvybingumui, o ląstelių gyvybingumas po poveikio išreiškiamas procentais nuo kontrolinių ląstelių.

#### 2.7.4 Santykinio sferoido tūrio įvertinimas

Sferoidai fotografuojami praėjus 120 val. po vaisto pridėjimo naudojant invertuotą mikroskopą Nikon ECLIPSE TS100, turintį Lumenera's INFINITY1-1M kamerą. Sferoidų tūris įvertinamas nuotraukas apdorojant SpheroidSizer programa. Kontrolinių sferoidų tūrių vidurkis prilyginamas 100%, o sferoido tūris po poveikio išreiškiamas procentais nuo kontrolinių sferoidų.

#### 2.8 Ląstelių viduje susikaupusio mTHPC matavimas

Ląstelių viduje susikaupusio mTHPC matavimui ląstelės užsėjamos į 6 šulinėlių plokštes (TPP) ir inkubuojamos tamsoje su 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mTHPC kaip aprašyta 2.5 skyriuje. Praėjus 18 val. nuo inkubacijos pradžios į ląstelės vidų nepatekęs mTHPC pašalinamas ląsteles 1 $\times$  praplaunant PBS tirpalu ir užpilant RMPI 1640 terpės su 10% NVS. Tada ląstelės 1 $\times$  praplaunamos 0,9% NaCl ir guminiu grandikliu sugramdomos į 0,55 mL 0,9% NaCl tirpalą. Į 0,4 mL ląstelių suspensijos sulašinama 0,05 mL 10% Tritono-X (galutinė koncentracija tirpale 1%) ir 0,05 mL metanolio. Į matavimo šulinėlį pilama po 100  $\mu\text{L}$  ląstelių lizato. Fluorescencija sužadinama  $\lambda_{\text{suž.}}=418$  nm, matuojama  $\lambda_{\text{em.}}=652$  nm fluorimetru Varioskan Flash. mTHPC koncentracija ląstelėse įvertinama pagal kalibracinę kreivę, kurioje atidėta žinomų kiekių mTHPC fluorescencija ląstelių lizatuose.

0,1 mL sugramdytų ląstelių suspensijos paimama baltymo koncentracijos nustatymui. Ląstelės nucentrifuguojamos, lizuojamos RIPA buferyje. Baltymo koncentracija nustatoma BCA metodu (žiūrėti 2.9.1 ir 2.9.2 skyrių). Nustačius baltymo koncentraciją ląstelėse mTHPC kiekis normalizuojamas mg baltymo (ng mTHPC/mg baltymo).

Viso darbo metu mėginiai saugomi nuo šviesos.

## 2.9 Genų raiškos palyginimas pagal transkriptų kieki

Ląstelės atkeliamos nuo paviršiaus guminiu grandikliu ir ląstelių suspensija centrifuguojama  $1000\times g$  7 min.  $+4^{\circ}C$ . Po centrifugavimo ląstelės  $1\times$  praplaunamos šaltu PBS tirpalu ir dar kartą nusodinamos centrifuguojant ( $1000\times g$  7 min.  $+4^{\circ}C$ ). RNR išskiriama pagal gamintojo rekomendacijas naudojant „GeneJET™ RNA Purification Kit“ rinkinį (Thermo Scientific). RNR koncentracija ir grynumas vertinamas NanoDrop 2000. Išskirta RNR laikoma  $-70^{\circ}C$ .

kDNR sintetinama iš 2  $\mu g$  RNR pagal gamintojo rekomendacijas naudojant „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ rinkinį (Thermo Scientific) termocikleryje Mastercycler. Kiekybinė PGR vykdoma 96 šulinėlių PGR plokštelėse termocikleryje StepOnePlus™ Real-Time PCR system vienai reakcijai panaudojant 50 ng kDNR, tiriamo geno transkriptui savitą pradmenų porą (2.3 lentelė) bei atitinkamą reakcijos mišinį.

**2.3 lentelė. Kiekybinei PGR naudoti pradmenys**

Genas	Pradmenų sekos arba TaqMan pradmenų ID
<i>ATG7</i>	Tiesioginis: 5'-CTGTGGTTGCCGGAAGTTG-3' Atvirkštinis: 5'-CCAGCAGAGTCACCATTGTAGT-3'
<i>MAP1LC3B</i>	Tiesioginis: 5'-GCACCTTCGAACAAAGAGTAGA-3' Atvirkštinis: 5'-GCTTCTCACCCCTGTATCGTT-3'
<i>TBP</i>	Tiesioginis: 5'-TGTACCGCAGCTGCAAAAT-3' Atvirkštinis: 5'-GGATTATATTCGGCGTTTCG-3'
<i>HES1</i>	Hs00172878_m1
<i>HEY1</i>	Hs01114113_m1
<i>HPRT1</i>	Hs99999909_m1

*ATG7* ir *MAP1LC3B* genų raiškos tyrimui naudojamas  $2\times$  „Maxima SYBR Green.ROX qPCR Master Mix“ (Thermo Scientific) mišinys. Šių genų raiška normalizuojama pagal „atskaitos“ geno *TBP* raišką. Pradmenys pasirenkami ant egzono-egzono ribos norint išvengti genominės DNR amplifikacijos.

*HES1* arba *HEY1* genų raiškos tyrimui naudojamas  $2\times$  „Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Master Mix“ (Thermo Scientific) mišinys. Šių genų raiška normalizuojama pagal „atskaitos“ geno *HPRT1* raišką.

Genų raiškos pokytis vertinamas  $\Delta\Delta C_T$  metodu. Santykinis transkripto kiekis, lyginant su kontrolinėmis ląstelėmis, apskaičiuojamas pagal formulę:

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

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



## 2.10 Western blot analizė

### 2.10.1 Baltymų išskyrimas

Guminiu gramdikliu nuo augimo indo paviršiaus atkeltos monoslukksniu kultivuojamos ląstelės arba  $\geq 30$  sferoidų centrifuguojami  $1000\times g$  7 min.  $+4^{\circ}C$ . Po centrifugavimo mėginiai  $1\times$  praplaunami šaltu PBS tirpalu ir dar kartą nusodinami centrifuguojant ( $1000\times g$  7 min.  $+4^{\circ}C$ ). Ląstelių nuosėdos/sferoidai lizuojami RIPA ląstelių lizės buferyje ant ledo 30 min. (100  $\mu L$  RIPA lizuojama  $1\times 10^6$  ląstelių arba 45 sferoidai). Ląstelių lizatai centrifuguojami  $14000\times g$  5 min.  $+4^{\circ}C$ . Baltymų koncentracija supernatante nustatoma BCA metodu.

### 2.10.2 BCA metodas

Metodas pagrįstas šarminėje terpėje baltymų vykdoma  $Cu^{2+}$  jonų redukcija, kurios metu susidarę  $Cu^{+}$  jonai formuoja violetinės spalvos kompleksus su bicinchonino rūgšties natrio druska (BCA- $Na_2$ ) (Smith *et al.*, 1985). Baltymų kiekio matavimui 1,5 mL mėgintuvėliuose sumaišoma 3  $\mu L$  ląstelių lizato, 27  $\mu L$  PBS ir 570  $\mu L$  BCA reagento (gaunamas sumaišius 100 dalių bicinchonino rūgšties tirpalo su 2 dalimis 4%  $CuSO_4\times 5H_2O$ ). Mišinys inkubuojamas 15 min.  $+37^{\circ}C$  ir atvėsinamas 10 min. palaikant  $+4^{\circ}C$  temperatūroje. Tirpalo sugertis  $A_{562}$  matuojama spektrofotometru Asys UVM340. Nežinomas baltymo kiekis nustatomas pagal kalibracinę kreivę, gautą su BCA reagentu inkubuojant 0 – 900  $\mu g/mL$  JSA turintį tirpalą.

### 2.10.3 Baltymų elektroforezė denatūruojančiomis sąlygomis

Baltymų lizatas, kuriame yra 50  $\mu g$  baltymo, praskiedžiamas PBS buferiu iki 37,5  $\mu L$  ir sumaišomas su 12,5  $\mu L$   $4\times$  baltymų užnešimo dažo (40% glicerolio, 8% NDS, 0,04% bromfenolio mėlio, 0,4 M DTT ir 250,4 mM Tris-HCl, pH 6,8). Mėginiai inkubuojami 5 min.  $+95^{\circ}C$  termomikseryje Thermomixer comfort. Po kaitinimo mėginiai atvėsinami  $+4^{\circ}C$ .

NDS-poliakrilamidinis gelis paruošiamas ant polimerinio 12% skiriamąjo gelio užpolimerinus 4% koncentruojamąjį gelio sluoksnį (2.4 lentelė). Pilnai užsipolimerinęs gelis įstatomas į baltymų elektroforezės aparatą Adjustable Height Dual Gel Unit, pripildytą  $1\times$  NDS elektroforezės buferio. Į kraštinius gelyje suformuotus šulinėlius įnešamas baltymų dydžio standartas „Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder“ (Thermo Scientific), o į kitus – paruošti mėginiai. Elektroforezė vykdoma 1 val. esant 80 V įtampai (baltymai sukcentruojami 4% gelio sluoksnyje) ir 3 val. esant 120 V įtampai (baltymai frakcionuojami 12% gelio sluoksnyje).

**2.4 lentelė. Skiriamąjo ir koncentruojamojo gelio sudėtis**

<b>Gelio sluoksnis</b>	<b>Sudėtis</b>
12% skiriamasis gelis	6 mL 30% akrilamido/0,8% bisakrilamido tirpalas 3,75 mL 1,5 M Tris-HCl su 0,4% NDS (pH 8,8) 5,25 mL H <sub>2</sub> O 10 µL TEMED 50 µL 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
4% koncentruojamasis gelis	0,65 mL 30% akrilamido/0,8% bisakrilamido tirpalas 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl su 0,4% NDS (pH 6,8) 3,05 mL H <sub>2</sub> O 5 µL TEMED 25 µL 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>

**2.10.4 Baltymų pernešimas ant nitroceliuliozinės membranos**

Išfrakcionuoti baltymai iš NDS-poliakrilamidinio gelio pernešami ant 0,45 µm nitroceliuliozinės membranos (BioRad) naudojant pusiau sauso pernešimo aparatą V20-SDB. Ant pernešimo buferiu sudrėkintos anodinės aparato dalies dedami 3 pernešimo buferyje sudrėkinti Whatman™ 3MM lapeliai, kurie yra 1 mm ilgesni ir platesni už gelį. Ant jų dedama tokio paties dydžio pernešimo buferyje sudrėkinta nitroceliuliozinė membrana, o ant jos – gelis su išfrakcionuotais baltymais. Sluoksniavimas baigiamas uždėjus dar 3 pernešimo buferyje sudrėkintus Whatman™ 3MM lapelius. Stikline lazdele išstumiami tarp sluoksnių esantys oro burbulai ir uždedamas pernešimo buferiu sudrėkintas katodinis šio aparato dangtis. Pernešimas vykdomas 1 val. esant 1 mA/cm<sup>2</sup> srovei.

**2.10.5 Baltymų vaizdinimas**

Nitroceliuliozinė membrana su perneštais baltymais blokuojama TBS/T buferyje turinčiame 5% JSA purtant 1 val.. Po to membrana sukarpoma juostelėmis taip, kad jose būtų po vieną detektuojamą baltymą. Membranos juostelės inkubuojamos su atitinkamais pirminiais antikūnais (2.5 lentelė), praskiestais TBS/T buferyje su 5% JSA per naktį purtant +4°C.

**2.5 lentelė. Western blot analizei naudoti pirminiai antikūnai**

<b>Antikūno taikiny</b>	<b>Baltymo dydis, kDa</b>	<b>Antikūno skiedimas</b>	<b>Antikūno kodas</b>	<b>Imunizuotas gyvūnas</b>
Nefosforilintas β-keninas	92	1:2000	8814S (Cell Signaling)	Triušis
NICD1	100	1:500	4147S (Cell Signaling)	Triušis
HES1	30	1:3000	PA5-28802 (Thermo Scientific)	Triušis
ATG7	75	1:1000	MAB6608 (R&D Systems)	Pelė
LC3B	12 ir 14	1:3000	ab51520 (Abcam)	Triušis
β-aktinas	42	1:10000	MA5-15739 (Thermo Scientific)	Pelė

Po inkubacijos su pirminių antikūnų tirpalu membranos plaunamos TBS/T buferiu purtant 1× 15 min. ir 2× po 5 min.. Po plovimo membranos

2 val. inkubuojamos tamsoje purtant +4°C su antriniais antikūnais praskiestais TBS/T buferyje su 5% JSA santykiu 1:5000. Nefosforilintas β-kateninas, NICD1, HES1 ir LC3B nustatomi naudojant su krienų peroksidaze konjuguotą antrinį antikūną prieš triušio IgG (#31460, Thermo Scientific), o ATG7 ir β-aktinas – su krienų peroksidaze konjuguotą antrinį antikūną prieš pelės IgG (#31430, Thermo Scientific). Po inkubacijos membranos plaunamos TBS/T buferiu purtant 1× 15 min. ir 2× po 5 min.. Prieš baltymų vaizdinimą membranos nuplaunamos dH<sub>2</sub>O ir išdžiovinamos.

Baltymai išryškunami membranas drėkinant ECL chemiluminescencinių reagentų (Thermo Scientific) mišiniu 1 min. ir jas eksponuojant ant fotojuostos Medical X-ray Film General Purpose Blue (Kodak). β-aktinas, ATG7, HES1, nefosforilintas β-kateninas ir LC3B eksponuojami 10 – 60 sek., o NICD1 5 – 12 min.

Baltymo juostelės intensyvumas įvertinamas ImageJ 1.52a programa, o santykinis baltymo kiekis apskaičiuojamas pagal formulę:

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

## 2.11 LC3B baltymo pasiskirtymo ląstelėse vaizdinimas

Ląstelės sėjamos į mikroskopijai skirtą 96 šulinėlių plokštelę (Ibidi) 2.6 lentelėje pateiktais tankiais ir auginamos pagal 2.1 pav. B pateiktą eksperimento schemą. Po poveikio vaistu praėjus 48 val. nusiurbiamo ląstelių kultivavimo terpė, o terpės likučiai pašalinami 1× ląsteles atsargiai praplaunant PBS buferiu. Tada ląstelės fiksuojamos ant jų užpylus ledinio metanolio. Po 5 min. metanolis nusiurbiamas, o jo likučiai pašalinami 1 min. ląsteles plaunant PBS buferiu. Užfiksuotos ląstelės inkubuojamos su blokavimo buferiu (PBS buferis su 3% JSA) 1 val. kambario temperatūroje ir su blokavimo buferyje 1:200 santykiu praskiestu pirminiu antikūnu prieš LC3B baltymą (ab51520, Abcam) per naktį +4°C. Nusiurbus pirminio antikūno tirpalą ląstelės 2× plaunamos PBS buferiu. Po plovimo ląstelės toliau inkubuojamos 1 val. tamsoje kambario temperatūroje blokavimo buferyje, kuriame yra 1:200 santykiu praskiestas su Alexa Fluor® 647 konjuguotas antrinis antikūnas prieš triušio IgG (A21244, Invitrogen). Nusiurbus antrinio antikūno tirpalą ląstelės 2× plaunamos PBS buferiu. LC3B imunofluorescencija registruojama invertuotu fluorescenciniu mikroskopu Olympus IX-81 (20× objektyvu, NA 0,55), turinčiu Hamamatsu ORCA-FLASH 4.0LT kamera. λ<sub>suž.</sub>=604 – 644 nm, λ<sub>em.</sub>=672 – 712 nm.

**2.6 lentelė. Ląstelių sėjimo tankiai mikroskopijos eksperimentams**

Ląstelių linija	Sėjimo tankis, ląstelių/šulinėliui	
	Kontrolė	Poveikis
HCT116	1500	3000
HCT116/FU	2000	4000
HCT116/OXA	2000	3000

## 2.12 Statistinė analizė

Duomenys apdoroti ir grafikai braižyti SigmaPlot 12.5 programa. Grafikuose pateikiami matavimų vidurkiai  $\pm$ SN gauti iš  $\geq 3$  nepriklausomų biologinių eksperimentų. Vertinant ląstelių gyvybingumą, santykinę geno raišką arba ląstelių viduje susikaupusio mTHPC kiekį kiekviename eksperimente naudojami  $\geq 3$  techniniai pakartojimai. Santykinio sferoido tūrio matavimuose viena vaisto doze paveikiama  $\geq 6$  sferoidai. 5-FU ir OxaPt  $IC_{50}$  dozės apskaičiuotos iš kreivių lygčių gautų regresinės analizės metu. 5-FU derinio su mTHPC efektas ląstelių gyvybingumui įvertintas atlikus dvifaktoriinę analizę (*angl.* Two-Way ANOVA). Signalinių kelių slopiklių derinio su 5-FU arba OxaPt efektas ląstelių gyvybingumui įvertintas naudojant pakartotinių matavimų ANOVA (*angl.* Repeated Measures ANOVA). Skirtumai tarp dviejų duomenų grupių palyginami naudojant Mann–Whitney U testą arba dviejų mėginių t testą. Duomenys laikomi statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

### 3. REZULTATAI

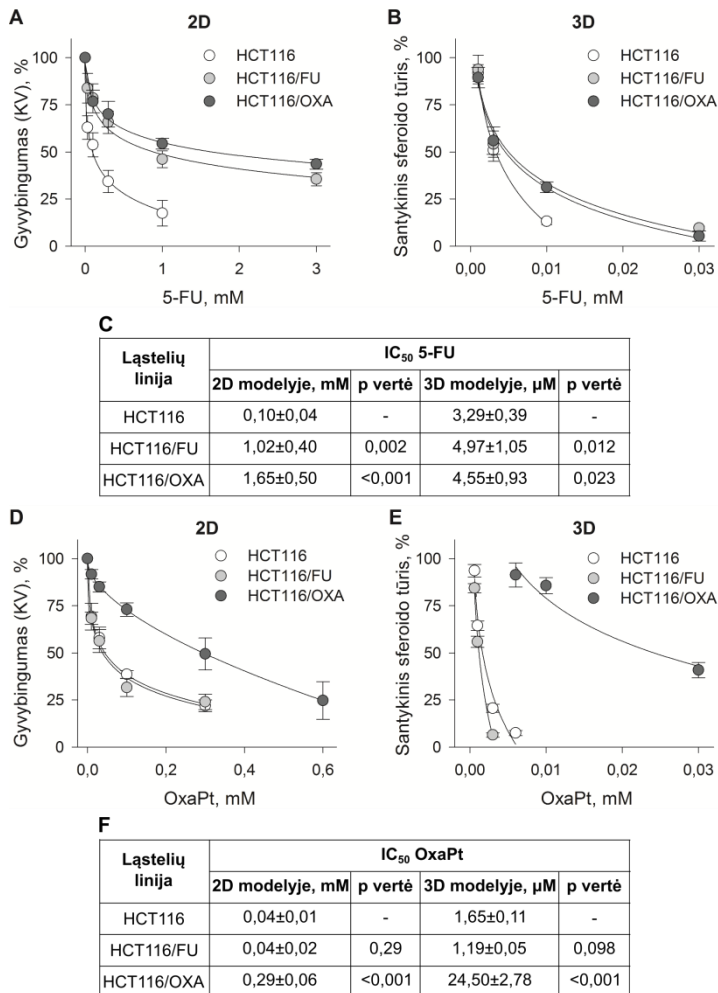
Šiame darbe tyrėme žmogaus kolorektalinės karcinomos HCT116 ląstelių liniją (priskiriamą CMS1 kolorektalinio vėžio subtipui (Frejno *et al.*, 2017; Linnekamp *et al.*, 2018)) ir iš jos mūsų laboratorijoje ilgalaikio kultivavimo su chemoterapiniais vaistais metu išvestas ląstelių sublinijas HCT116/FU (gauta auginant terpėje su 5-FU) ir HCT116/OXA (gauta auginant terpėje su OxaPt). Tyrimai buvo atliekami ląsteles kultivuojant monosluoksniu (2D modelis) arba iš ląstelių formuojant daugialąstelinius sferoidus (3D modelis). Chemoterapiniams vaistams atspariose ir tėvinėse ląstelėse tyrėme: 1) autofagijos intensyvumą; 2) Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumą; 3) Notch1 signalinio kelio aktyvumą. Įvertinome šių procesų reikšmę ląstelių išgyvenimui (atsparumui chemoterapiniams vaistams) bei jų pokyčius po 5-FU ir OxaPt poveikių. Kadangi chemoterapiniams vaistams atsparios ląstelės retai įgauna atsparumą fotodinaminiam poveikiui (Spring *et al.*, 2015), palyginome HCT116 ir HCT116/FU ląstelių jautrumą mTHPC-FDP, jo deriniui su 5-FU bei įvertinome šių poveikių įtaką autofagijos procesui.

#### 3.1 Ląstelių atsparumas chemoterapiniams vaistams arba fotodinaminiam poveikiui

##### 3.1.1 Ląstelių atsparumas 5-FU ir OxaPt

Norėdami įvertinti 5-FU ir OxaPt citotoksiškumą ląstelėms bei nustatyti HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių atsparumo šiems vaistams mastą atlikome dviejų tipų eksperimentus – vertinome monosluoksniu kultivuojamų ląstelių gyvybingumą kristaliniu violetiniu (KV) bei santykinį daugialąstelinio sferoido tūrį. Pirmiausiai šiems eksperimentams parinkome optimalius HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelių sėjimo tankius, kad vaistais paveiktume panašų ląstelių kiekį. Monosluoksniu eksperimentams pasirinkta HCT116 ląsteles sėti  $1,0 \times 10^5$  ląstelių/mL, HCT116/FU ląsteles –  $2,0 \times 10^5$  ląstelių/mL, o HCT116/OXA ląsteles –  $1,5 \times 10^5$  ląstelių/mL tankiu. Tokiu atveju ląstelių skaičius skirtingose sublinijose nesiskiria nei vaisto pridėjimo metu (t.y. 48 val. po ląstelių užsėjimo), nei vertinant ląstelių gyvybingumą (t.y. 96 val. po ląstelių užsėjimo) (1 priedas A).

Pasirenkant ląstelių sėjimo tankius daugialąstelių sferoidų formavimui siekiama, kad vaisto poveikio metu sferoidas būtų pilnai susiformavęs t.y. turėtų tris proliferacines zonas – besidalijančių ląstelių, ramybės būsenoje esančių ląstelių (nesidalijančios ląstelės) bei nekrozinę šerdį. Tokiuose



**3.1 pav. 5-FU ir OxaPt citotoksiškumas HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėms.** Ląstelių gyvybingumo (A) ir santykinio sferoido tūrio (B) priklausomybė nuo 5-FU koncentracijos ir iš kreivių lygčių suskaičiuotos 5-FU IC<sub>50</sub> dozės (C). Ląstelių gyvybingumo (D), santykinio sferoido tūrio (E) priklausomybė nuo OxaPt koncentracijos ir iš kreivių lygčių suskaičiuotos OxaPt IC<sub>50</sub> dozės (F). Ląstelių gyvybingumas įvertintas praėjus 48 val. po vaisto poveikio. Santykinis sferoido tūris – 120 val. po vaisto poveikio. Paklaidos: ±SN; n≥3.

sferoiduose ląstelių heterogeniškumas yra panašesnis į esantį *in vivo* navikuose (Zanoni *et al.*, 2016). Yra nustatyta, kad HCT116 ląstelių sferoidai, kurių skersmuo 400 μm, jau turi nekrozinę šerdį (Goschl *et al.*, 2017). Kadangi, susiformavęs sferoidas gali būti šiek tiek nukrypęs nuo idealios sferos, svarbesnis parametras sferoidų atrankai – sferoido tūris, kuris apskaičiuojamas pagal formulę  $V=0,5 \times \text{ilgis} \times \text{plotis}^2$  (čia ilgis – sferoido skersmuo didžiojoje ašyje, plotis – sferoido skersmuo mažojoje ašyje) (Chen *et al.*, 2014). Eksperimentiškai nustatėme, kad 400 μm skersmens taisyklingos formos HCT116 ląstelių sferoidai būna  $0,0210 \pm 0,0012 \text{ mm}^3$

tūrio. Tokį tūrį sferoidai pasiekia per 96 val. po ląstelių užsėjimo, HCT116 ląstelės sėjant  $3,75 \times 10^3$  ląstelių/mL, HCT116/FU ląstelės –  $4,75 \times 10^3$  ląstelių/mL, o HCT116/OXA ląstelės –  $4,25 \times 10^3$  ląstelių/mL tankiu (1 priedas B). Be to, eksperimentams atrenkami tik taisyklingos formos sferoidai (1 priedas C).

Tada pagal 2.1 pav. A ir 2.2 pav. pateiktas eksperimentų schemas įvertinome 5-FU arba OxaPt citotoksiškumą monosluoksniu kultivuojamų ląstelėms ir daugialąsteliniais sferoidams (3.1 pav.). Atlikę regresinę analizę iš eksponentinių kreivių lygčių (2 priedas) nustatėme teorines šių vaistų dozes, kurios nužudo 50% ląstelių arba 50% sumažina sferoido tūrį ( $IC_{50}$ ) (3.1 pav. C, F). Monosluoksniu kultivuojamos HCT116/FU ląstelės yra apie 10,2 karto atsparesnės ( $p=0,002$ ), o sferoidai – apie 1,5 karto atsparesni 5-FU ( $p=0,012$ ) už HCT116 ląsteles/ląstelių sferoidus. Visgi, HCT116/FU ląstelės nepasižymi atsparumu OxaPt nei 2D ( $p=0,290$ ), nei 3D modeliuose ( $p=0,098$ ). HCT116/OXA ląstelės/sferoidai yra atsparesnės 5-FU poveikiui (2D modelyje – apie 16,5 karto ( $p<0,001$ ), 3D modelyje – apie 1,4 karto ( $p=0,023$ )) ir OxaPt poveikiui (2D modelyje – apie 7,25 karto ( $p<0,001$ ), 3D modelyje – apie 14,8 kartų ( $p<0,001$ )) už HCT116 ląsteles/sferoidus.

Remiantis šiais rezultatais galima padaryti išvadą, kad palyginus su HCT116 ląstelėmis: 1) HCT116/FU ląstelės yra atsparios tik 5-FU poveikiui; 2) HCT116/OXA ląstelės pasižymi atsparumu ir 5-FU, ir OxaPt.

Molekuliniams ląstelių atsako tyrimams pasirinkome po dvi 5-FU (0,1 mM ir 0,3 mM) ir OxaPt (0,03 mM ir 0,06 mM) dozes, kurios atitinkamai nužudo 50% arba 70% HCT116 ląstelių. Šių dozių citotoksiškumas (CTT) HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių linijoms pateiktas 3.1 lentelėje.

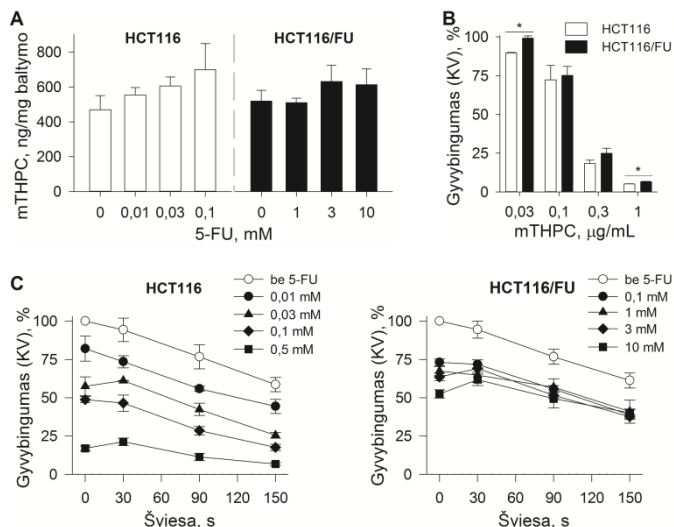
**3.1 lentelė. Ląstelių atsako į 5-FU ir OxaPt tyrimuose naudotos vaistų dozės ir jų citotoksiškumas (CTT) ląstelėms**

Ląstelių linija	5-FU, mM		OxaPt, mM	
	0,1	0,3	0,03	0,06
HCT116	CTT50	CTT70	CTT50	CTT70
HCT116/FU	CTT20	CTT30	CTT50	CTT70
HCT116/OXA	CTT20	CTT30	CTT10	CTT20

### 3.1.2 Ląstelių atsparumas mTHPC-FDP ir jo deriniui su 5-FU

mTHPC-FDP derinio su 5-FU citotoksiškumą HCT116 ir HCT116/FU ląstelėms įvertinome pagal 2.3 pav. pateiktą eksperimento schemą. Nustatėme, kad po 18 val. inkubacijos su 0,1  $\mu\text{g/mL}$  mTHPC, HCT116 ir

HCT116/FU ląstelėse prikaupiami panašūs mTHPC kiekiai. Be to, ląstelių viduje priklaupiamas mTHPC kiekis nepriklauso nuo poveikio 5-FU (3.2 pav. A). HCT116 ir HCT116/FU ląstelės yra vienodai jautrios mTHPC-FDP – didėjant mTHPC koncentracijai ląstelių inkubavimo terpėje, didėja ir FDP citotoksiškumas, ląsteles apšviečiant 90s (3.2 pav. B). Panaši citotoksiškumo priklausomybė nuo dozės stebima ir pasirinkus 0,1  $\mu\text{g/mL}$  mTHPC koncentraciją, bet ilginant ląstelių apšvietimo trukmę (3.2 pav. C be 5-FU). Norėdami įvertinti mTHPC-FDP derinimo su 5-FU efektyvumą atlikome dvifaktoriinę analizę (*angl.* Two-Way ANOVA). Nustatėme, kad mTHPC-FDP derinio su 5-FU citotoksiškumas HCT116 ląstelėms priklauso nuo abiejų determinančių – FDP trukmės ir 5-FU koncentracijos ( $p < 0,001$ ). Tuo tarpu mTHPC-FDP derinio su 5-FU citotoksiškumas HCT116/FU ląstelėse priklauso tik nuo FDP trukmės, o 5-FU pridėjimas FDP efektyvumo nepadidina ( $p = 0,282$ ) (3.2 lentelė).



**3.2 pav. mTHPC sukeltas fotodinaminis poveikis HCT116 ir HCT116/FU ląstelėms.** A, ląstelių viduje sukaupto mTHPC kiekio priklausomybė nuo 5-FU koncentracijos. Ląstelių gyvybingumas praėjus 24 val. po ląstelių apšvietimo: priklausomybė mTHPC koncentracijos (B), priklausomybė nuo mTHPC-FDP ir 5-FU koncentracijos (C). Praėjus 18 val. po mTHPC ir/arba 5-FU pridėjimo buvo pakeičiama ląstelių kultivavimo terpė ir ląstelės lizuojamos viduląstelinio mTHPC kiekio matavimams arba apšviečiamos  $\lambda = 660 \pm 5$  nm šviesa, kurios intensyvumas  $1,6 \text{ mW/cm}^2$ . A ir C atvejais ląstelės buvo inkubuotos su  $0,1 \mu\text{g/mL}$  mTHPC. B atveju ląstelės buvo apšviestos 90s. Brūkšniai  $\pm\text{SN}$ ;  $n \geq 3$ .

**3.2 lentelė. FDP trukmės ir 5-FU koncentracijos reikšmingumas citotoksiškumui**

Ląstelės / Poveikis	HCT116		HCT116/FU	
	F reikšmė <sub>(II)</sub>	p reikšmė	F reikšmė <sub>(II)</sub>	p reikšmė
FDP	162 <sub>(2, 12)</sub>	<0,001	106 <sub>(2, 18)</sub>	<0,001
5-FU	77 <sub>(3, 12)</sub>	<0,001	1 <sub>(2, 18)</sub>	0,282
5-FU + FDP	1 <sub>(6, 12)</sub>	0,623	2 <sub>(4, 18)</sub>	0,115

\* II, laisvės laipsniai



Taigi pavienis mTHPC-FDP veikia panašiai HCT116/FU ir HCT116 ląstelių gyvybingumą. HCT116 ląstelėse 5-FU sustiprina mTHPC-FDP citotoksiškumą, o HCT116/FU ląstelėse – neturi poveikio mTHPC-FDP citotoksiškumui.

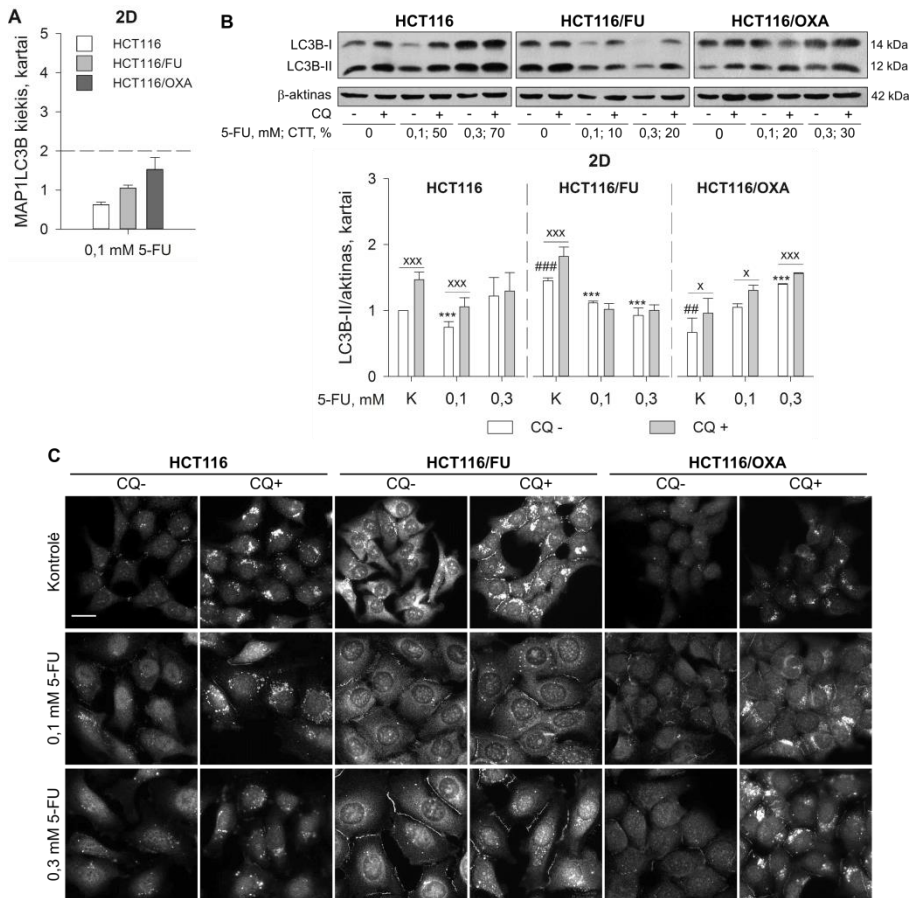
### 3.2 Autofagija

5-FU, OxaPt arba mTHPC-FDP įtaką autofagijai vertinome pagal prie autofaginių membranų prijungto LC3B-II baltymo kiekį (t.y. LC3B baltymas prie kurio prijungtas fosfatidiletanolaminas; daugiau informacijos 1.4 skyriuje), kuris koreliuoja su autofagosomų kiekiu (Kabeya *et al.*, 2000). Taip pat nustatėme LC3/GABARAP baltymų aktyvacijoje dalyvaujančio ATG7 baltymo kiekį bei vertinome autofagijos srautą, kuris parodo ar vyksta galutinės autofagijos stadijos ir autofagosomų turinio suskaidymas. Jis nustatomas palyginus momentinį autofagosomų kiekį su bendru autofagosomų kiekiu, kuris įvertinamas autofagosomų skaidymą lizosomose nuslopinus CQ.

#### 3.2.1 5-FU arba OxaPt poveikis autofagijai

Palyginę santykinį LC3B-II formos baltymo kiekį kontrolinėse ląstelėse pastebėjome, kad chemoterapiniams vaistams atsparios HCT116/FU ląstelės pasižymi apie 1,5 karto didesniu ( $p < 0,001$ ), o HCT116/OXA ląstelės – apie 1,5 karto mažesniu ( $p = 0,007$ ) šios baltymo formos kiekiu nei HCT116 ląstelės (3.3 pav. B). Nesant citotoksinio poveikio visose tirtose ląstelių linijose stebimas statistiškai reikšmingas bazinis autofagijos srautas: HCT116 ląstelėse autofagosomų skaidymo lizosomose slopinimas 30  $\mu$ M CQ, LC3B-II baltymo kiekį padidina apie 1,5 karto ( $p < 0,001$ ), HCT116/FU ląstelėse – apie 1,3 karto ( $p < 0,001$ ), HCT116/OXA ląstelėse – apie 1,4 karto ( $p = 0,036$ ). Reikšmingas autofagijos srautas vaistais neveiktose ląstelėse stebimas ir pagal LC3B baltymo pasisiskirstymą ląstelėje (3.3 pav. C). Neslopinant autofagosomų skaidymo LC3B baltymas kontrolinėse ląstelėse pasiskirsto difuziškai bei matomos pavienės šio baltymo sankaupos – autofagosomos. Tuo tarpu po 30  $\mu$ M CQ poveikio LC3B baltymo sankaupų (t.y. autofagosomų) reikšmingai padaugėja.

Toliau vertinome ar 5-FU veikia LC3B geno bei baltymo raišką. 0,1 mM 5-FU neturi reikšmingo poveikio LC3B baltymą koduojančio *MAP1LC3B* transkripto kiekiui (3.3 pav. A), bet keičia santykinį LC3B-II formos baltymo kiekį (3.3 pav. B) – šios baltymo formos kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse sumažina apie 1,3 karto (atitinkamai  $p < 0,001$  ir



**3.3 pav. 5-FU poveikis LC3B kiekiui HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėse.** A, Santykinis *MAP1LC3B* transkripto kiekio pokytis praėjus 24 val. po 5-FU poveikio. B, LC3B-II baltymo kiekio pokytis praėjus 48 val. po 5-FU poveikio. C, LC3B baltymo pasiskirstymas ląstelėse praėjus 48 val. po poveikio 5-FU. Autofagosomų skaidymas slopintas pridant 30  $\mu$ M CQ 4 val. prieš baltymų skyrimą/immunofluorescencinę analizę. Mastelio juosta – 20  $\mu$ m; K, kontrolinės t.y. vaistu neveiktos ląstelės; punktyrinė linija – reikšmingu laikomo pokyčio slenkstinė riba; brūkšniai  $\pm$ SN;  $n \geq 3$ .

#, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp HCT116/FU arba HCT116/OXA ląstelių palyginus su HCT116 ląstelėmis;

\*, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu veiktų ir kontrolinių ląstelių;

x, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp CQ paveiktų ir neveiktų ląstelių;

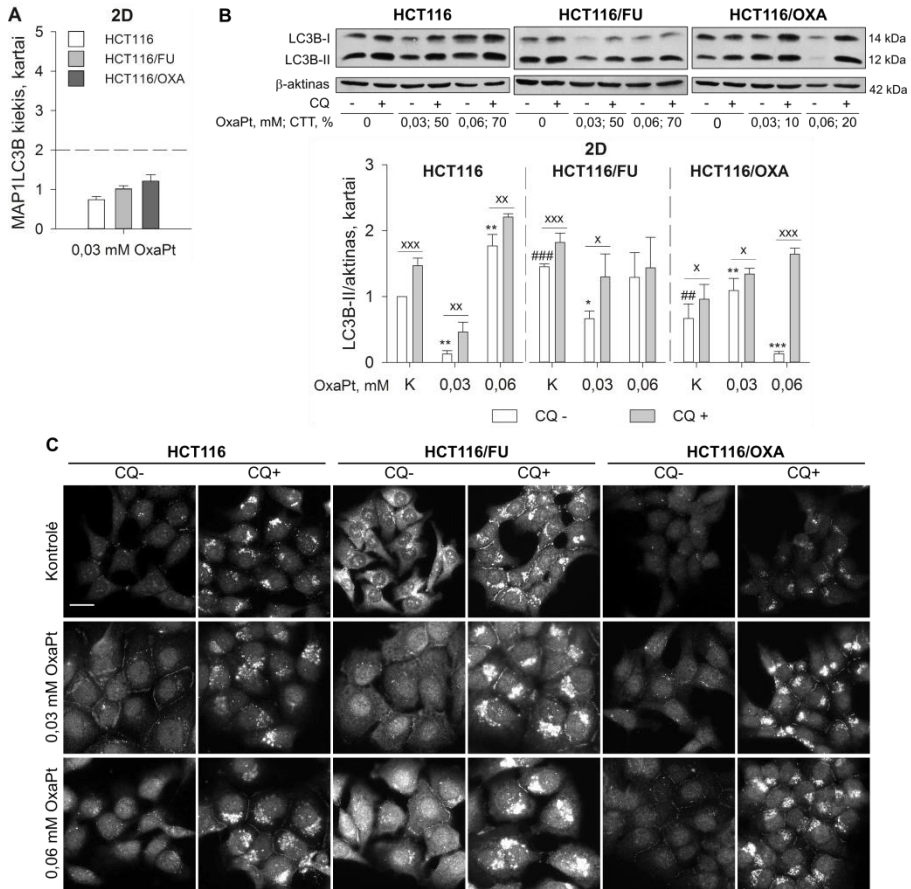
#/\*  $p < 0,05$ ; xx/##/\*\*  $p \leq 0,01$ ; xxx/###/\*\*\*  $p \leq 0,001$ .

$p < 0,001$ ). O HCT116/OXA ląstelėse po šios 5-FU dozės stebima LC3B-II baltymo kiekio tendencija didėti ( $P = 0,056$ ). Tuo tarpu 0,3 mM 5-FU keičia LC3B-II baltymo kiekį tik chemoterapiniams vaistams atspariose ląstelėse: apie 1,6 karto sumažina HCT116/FU ląstelėse ( $p < 0,001$ ) ir apie 2,1 karto padidina HCT116/OXA ląstelėse ( $p < 0,001$ ). Slopindami autofagosomų skaidymą CQ pastebėjome, kad 5-FU nevienodai stipriai veikia autofagijos srautą. Stipriausias 5-FU poveikis pastebimas HCT116/FU ląstelėse – jose

abi 5-FU dozės slopina autofagiją: 3.3 pav. B matyti, kad po šių poveikių nebėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp momentinio LC3B-II formos kiekio ir LC3B-II formos kiekio nuslopinus autofagosomų skaidymą, o 3.3 pav. C – sumažėjęs LC3B baltymo sancaupų kiekis. HCT116 ląstelėse 0,1 mM 5-FU neturi įtakos autofagijos srautui, o 0,3 mM dozė šį srautą slopina. Tuo tarpu HCT116/OXA ląstelėse 5-FU turi silpnę poveikį autofagijos srautui – po 0,1 mM 5-FU poveikio ir autofagosomų skaidymo slopinimo CQ LC3B-II baltymo padaugėja 1,2 karto ( $p=0,048$ ) t.y. autofagijos srautas yra 1,15 karto mažesnis nei kontrolinėse ląstelėse; po 0,3 mM 5-FU poveikio ir CQ LC3B-II baltymo padaugėja 1,1 karto ( $p=0,001$ ) t.y. autofagijos srautas yra 1,3 karto mažesnis nei kontrolinėse ląstelėse. Reikšmingas autofagijos srautas po abiejų 5-FU dozių HCT116/OXA ląstelėse taip pat stebimas ir pagal LC3B baltymo sancaupų pagausėjimą po autofagosomų skaidymo slopinimo CQ.

0,03 mM OxaPt neturi reikšmingo poveikio *MAP1LC3B* transkripto kiekiui (3.4 pav. A). Ši OxaPt dozė santykinį LC3B-II formos baltymo kiekį HCT116 ląstelėse sumažina apie 7,9 karto ( $p<0,001$ ), HCT116/FU ląstelėse – apie 2,2 karto ( $P=0,016$ ), o HCT116/OXA ląstelėse padidina apie 1,6 karto ( $p=0,01$ ) (3.4 pav. B). Nuslopinus autofagosomų skaidymą, LC3B-II baltymo kiekio pokyčiai nevienodi: HCT116 ląstelėse padidėja 3,7 karto ( $p=0,005$ ) t.y. autofagijos srautas yra 2,5 karto didesnis negu kontrolinėse ląstelėse; HCT116/FU ląstelėse – 2 kartus ( $p=0,035$ ) t.y. autofagijos srautas yra 1,6 karto didesnis negu kontrolinėse ląstelėse; HCT116/OXA ląstelėse – 1,2 karto ( $p=0,047$ ) t.y. autofagijos srautas yra 1,2 karto mažesnis negu kontrolinėse ląstelėse. Panašios tendencijos matyti ir vertinant LC3B baltymo pasiskirstymą ląstelėse – nuslopinus autofagosomų skaidymą visose tirtose ląstelėse padaugėja LC3B baltymo sancaupų (3.4 pav. C 0,03 mM OxaPt poveikis).

0,06 mM OxaPt dozė LC3B-II formos baltymo kiekį veikia skirtingai nei mažesnė dozė – HCT116 ląstelėse šios baltymo formos kiekis padidėja apie 1,8 karto ( $p=0,008$ ), HCT116/OXA ląstelėse – sumažėja apie 5,2 karto ( $p<0,001$ ), o HCT116/FU ląstelėse neturi reikšmingo poveikio ( $p=0,370$ ). Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp momentinio LC3B-II baltymo kiekio ir šio baltymo kiekio nuslopinus autofagosomų skaidymą stebimas HCT116 ir HCT116/OXA ląstelėse – HCT116 ląstelėse LC3B-II baltymo padaugėja 1,2 karto ( $p=0,009$ ) t.y. autofagijos srautas po šio poveikio yra apie 1,2 karto mažesnis negu kontrolinėse ląstelėse; HCT116/OXA ląstelėse LC3B-II baltymo padaugėja apie 12,7 karto t.y. autofagijos srautas yra apie 8,8 karto



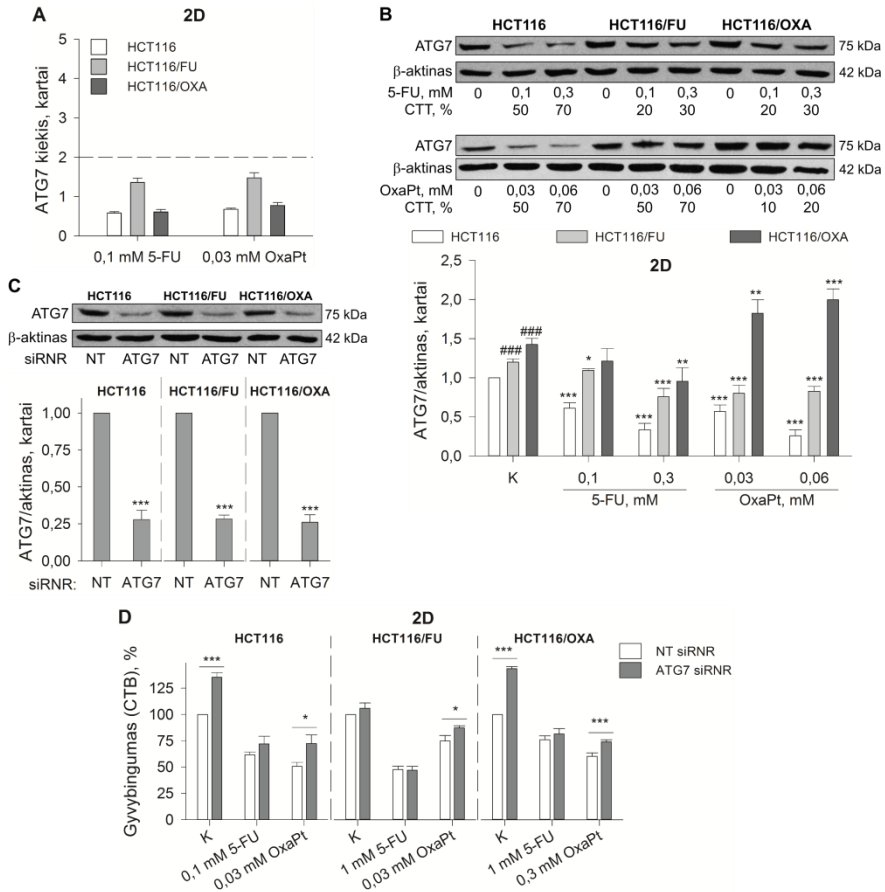
**3.4 pav. OxaPt poveikis LC3B kiekiui HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėse.** A, Santykinis *MAP1LC3B* transkripto kiekio pokytis praėjus 24 val. po OxaPt poveikio. B, LC3B-II baltymo kiekio pokytis praėjus 48 val. po OxaPt poveikio. C, LC3B baltymo pasiskirstymas ląstelėse praėjus 48 val. po poveikio OxaPt. Autofagosomų skaidymas slopintas pridendant 30  $\mu$ M CQ 4 val. prieš baltymų skyrimą/immunofluorescencinę analizę. Mastelio juosta – 20  $\mu$ m; K, kontrolinės t.y. vaistu neveiktos ląstelės; punktyrinė linija – reikšmingu laikomo pokyčio slenkstinė riba; brūkšniai  $\pm$ SN;  $n \geq 3$ . #, statistškai reikšmingas skirtumas tarp HCT116/FU arba HCT116/OXA ląstelių palyginus su HCT116 ląstelėmis; \*, statistškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu veiktų ir kontrolinių ląstelių; x, statistškai reikšmingas skirtumas tarp CQ paveiktų ir neveiktų ląstelių; #/\*  $p < 0,05$ ; xx/##/\*\*  $p \leq 0,01$ ; xxx/###/\*\*\*  $p \leq 0,001$ .

didesnis negu kontrolinėse ląstelėse. Tuo tarpu HCT116/FU ląstelėse po 0,06 mM OxaPt poveikio stebimos didelės santykinio LC3B-II baltymo kiekio variacijos. Pagal LC3B baltymo pasiskirstymą ląstelėse matyti, kad po 0,06 mM OxaPt poveikio autofagijos srautas yra reikšmingas HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse (3.4 pav. C).

Nustatėme, kad kontrolinėms HCT116/FU ląstelėms yra būdingas 1,2 karto didesnis ( $p < 0,001$ ), o HCT116/OXA ląstelėms – 1,4 karto didesnis ( $p < 0,001$ ) ATG7 baltymo kiekis negu HCT116 kontrolinėms ląstelėms (3.5 pav. B). 0,1 mM 5-FU arba 0,03 mM OxaPt poveikis neturi reikšmingo poveikio ATG7 transkripto kiekiui (3.5 pav. A), bet sumažina santykinį ATG7 baltymo kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse: po 0,1 mM 5-FU poveikio ATG7 kiekis sumažėja 39% HCT116 ( $p < 0,001$ ) ir 9% HCT116/FU ( $p = 0,016$ ); po 0,03 mM OxaPt – 43% HCT116 ( $p < 0,001$ ) ir 33% HCT116/FU ( $p = 0,001$ ). Šiose ląstelių linijose ATG7 kiekis sumažėja ir po didesnių 5-FU arba OxaPt dozių: po 0,3 mM 5-FU – 67% HCT116 ( $p < 0,001$ ) ir 37% HCT116/FU ( $p < 0,001$ ); po 0,06 mM – 74% HCT116 ( $p < 0,001$ ) ir 31% HCT116/FU ląstelėse ( $p < 0,001$ ). Tuo tarpu HCT116/OXA ląstelėse ATG7 baltymo kiekį reikšmingai sumažina tik 0,3 mM 5-FU poveikis (šio baltymo kiekis sumažėja 33%,  $p = 0,005$ ), o po abiejų OxaPt poveikių padidėja (po 0,03 mM OxaPt padidėja 23%,  $p = 0,008$ ; po 0,06 mM OxaPt – 29%,  $p < 0,001$ ).

Įvertinome kaip ATG7 baltymo kiekio sumažinimas veikia 5-FU arba OxaPt citotoksiškumą HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėms. Eksperimentus atlikome pagal 2.4 pav. pateiktą schemą. ATG7 baltymo raiškos sumažinimui naudojome tokias ląstelių transfekcijos su ATG7 savita siRNR (ATG7 siRNR) sąlygas, kad šio baltymo kiekis visose ląstelių linijose praėjus 48 val. po ląstelių transfekcijos sumažėtų apie 75% (HCT116 ląstelėse  $p < 0,001$ ; HCT116/FU –  $p < 0,001$ ; HCT116/OXA –  $p < 0,001$ ) (3.11 pav. C). CTB metodu įvertinę ląstelių gyvybingumą pastebėjome, kad ATG7 baltymo kiekio sumažinimas padidina 35% kontrolinių HCT116 ( $p < 0,001$ ) ir 40% HCT116/OXA ( $p < 0,001$ ) ląstelių gyvybingumą, bet neveikia HCT116/FU ląstelių gyvybingumo (3.5 pav. D). ATG7 kiekio sumažinimas nekeičia 5-FU citotoksiškumo, bet sumažina OxaPt citotoksiškumą – HCT116 ląstelėse 0,03 mM OxaPt citotoksiškumas sumažėja 23% ( $p = 0,026$ ), HCT116/FU ląstelėse 0,03 mM OxaPt – 12% ( $p = 0,038$ ), o HCT116/OXA ląstelėse 0,3 mM OxaPt – 14% ( $p = 0,004$ ).

Remiantis šiais rezultatais galime daryti kelias išvadas. Pirma, kontrolinės HCT116/FU ląstelės pasižymi didesniu, o HCT116/OXA ląstelės – mažesniu LC3B-II baltymo kiekiu negu kontrolinės HCT116 ląstelės. Antra, 5-FU slopina autofagijos srautą HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. Trečia, po OxaPt poveikio autofagijos srautas išlieka reikšmingas visose tirtose ląstelių linijose. Ketvirta, ATG7 baltymo kiekio sumažinimas siRNR nekeičia 5-FU citotoksiškumo ir sumažina OxaPt citotoksiškumą visoms ląstelėms.



**3.5 pav. ATG7 kiekis ir slopinimas HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėse.** 5-FU arba OxaPt poveikis santykiniai ATG7 transkripto (A) arba baltymo (B) kiekiui. C, ATG7 siRNR įtaka ATG7 baltymo kiekiui praėjus 48 val. po siRNR transfekcijos. D, ATG7 siRNR derinių su 5-FU arba OxaPt įtaka ląstelių gyvybingumui. Ląstelės buvo transfekuotos ATG7 siRNR arba NT siRNR 24 val. prieš poveikį vaistu. Ląstelių gyvybingumas įvertintas praėjus 48 val. po poveikio vaistu. CTB, CellTiter-Blue®; brūkšniai ±SN; n≥3.

#, statistškai reikšmingas skirtumas tarp HCT116/FU arba HCT116/OXA ląstelių palyginus su HCT116 ląstelėmis;

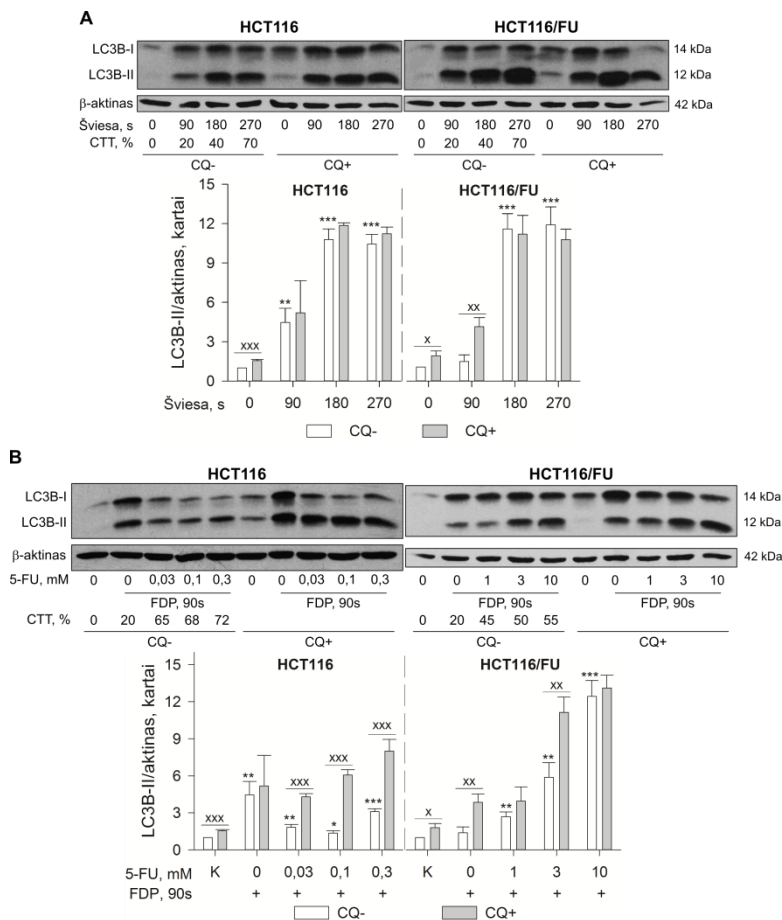
\*, statistškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu veiktų ir kontrolinių ląstelių;

##/\* p<0,05; ###/\*\* p≤0,01; ####/\*\* p≤0,001.

### 3.2.2 Autofagija po mTHPC-FDP ir jo derinio su 5-FU

Pavienis mTHPC-FDP reikšmingai padidina LC3B-II formos kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse (3.6 pav. A). HCT116 ląstelėse 90 s FDP padidina šio baltymo kiekį 4,5 karto (p=0,006), 180 s – 10,8 karto (p<0,001), 270 s – 10,5 karto (p<0,001). Tuo tarpu HCT116/FU ląstelėse 180 s FDP padidina LC3B-II baltymo kiekį 10,8 karto (p<0,001), 270 s – 11,1 karto (p<0,001), o 90 s – neturi reikšmingo poveikio šio baltymo kiekiui. Visgi,

šių autofagosomų turinys nesuskaidomas – nėra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp momentinio autofagosomų kiekio ir autofagosomų kiekio nuslopinus autofagosomų skaidymą CQ. Išimtis pastebima tik HCT116/FU ląstelėse, kur 90 s FDP sukelia 1,6 karto didesnį autofagijos srautą negu stebimas kontrolinėse ląstelėse ( $p=0,006$ ).



**3.6 pav. mTHPC-FDP (A) arba jo derinio su 5-FU (B) įtaka santykiniam LC3B-II baltymo kiekiui HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse.** LC3B-II baltymo kiekio pokytis registruotas praėjus 24 val. po ląstelių paveikimo šviesa. Autofagijos srauto slopinimui ląstelės paveiktos 30  $\mu$ M CQ 4 val. prieš baltymų skyrimą. K, kontrolinės t.y. vaistu/FDP neveiktos ląstelės; brūkšniai  $\pm$ SN;  $n \geq 3$ .

x, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp CQ paveiktų ir neveiktų ląstelių;

\*, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu/FDP veiktų ir kontrolinių ląstelių;

x/\*  $p < 0,05$ ; xx/\*\*  $p < 0,01$ ; xxx/\*\*  $p < 0,001$ .

Tirdami mTHPC-FDT derinio su 5-FU poveikį autofagijai nustatėme, kad 5-FU pridėjimas skirtingai veikia santykinį autofagosomų kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse (3.6 pav. B). Palyginus su pavieniu 90s FDP, HCT116 ląstelėse 0,03 mM arba 0,1 mM 5-FU pridėjimas lemia LC3B-II

formos sumažėjimą – 0,03 mM 5-FU sumažina šios formos kiekį 2,4 karto ( $p=0,016$ ), 0,1 mM 5-FU – 3,3 karto ( $p=0,009$ ). Tuo tarpu HCT116/FU ląstelėse 5-FU derinimas su 90s FDP lemia didesnę LC3B-II formos baltymo kiekį negu stebimas po pavienio FDP: pridėjus 1 mM 5-FU šio baltymo kiekis padidėja 1,9 karto ( $p=0,021$ ), 3 mM 5-FU – 4,3 karto ( $p=0,004$ ), 10 mM 5-FU – 9 kartus ( $p<0,001$ ).

Taip pat skiriasi ir 5-FU pridėjimo poveikis autofagijos srautui. HCT116 ląstelėse 5-FU pridėjimas padidina autofagijos srautą: 90s FDP derinys su 0,03 mM 5-FU autofagijos srautą padidina 2 kartus ( $p<0,001$ ) palyginus su srautu stebimu po pavienio 90s FDP, 0,1 mM 5-FU – 3,8 karto ( $p<0,001$ ), 0,3 mM 5-FU – 2,2 karto ( $p<0,001$ ). O HCT116/FU ląstelėse 5-FU pridėjimas šį srautą sumažina – derinant 90s FDP su 3 mM 5-FU srautas sumažėja 1,5 karto ( $p=0,006$ ) palyginus su pavieniui 90s FDP, o 1 mM ir 10 mM 5-FU pridėjimas sumažina autofagijos srautą tiek, kad šis tampa statistiškai nebereikšmingu.

Taigi apibendrinant šiuos rezultatus, galime daryti kelias išvadas. Pirma, pavienis mTHPC-FDP padidina autofagosomų kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. Antra, HCT116 ląstelėse 5-FU padidina po mTHPC-FDP stebimą autofagijos srautą, bet sumažina autofaginių membranų kiekį. HCT116/FU ląstelėse 5-FU sumažina mTHPC-FDP sukeltą autofagijos srautą bei padidina autofagosomų kiekį.

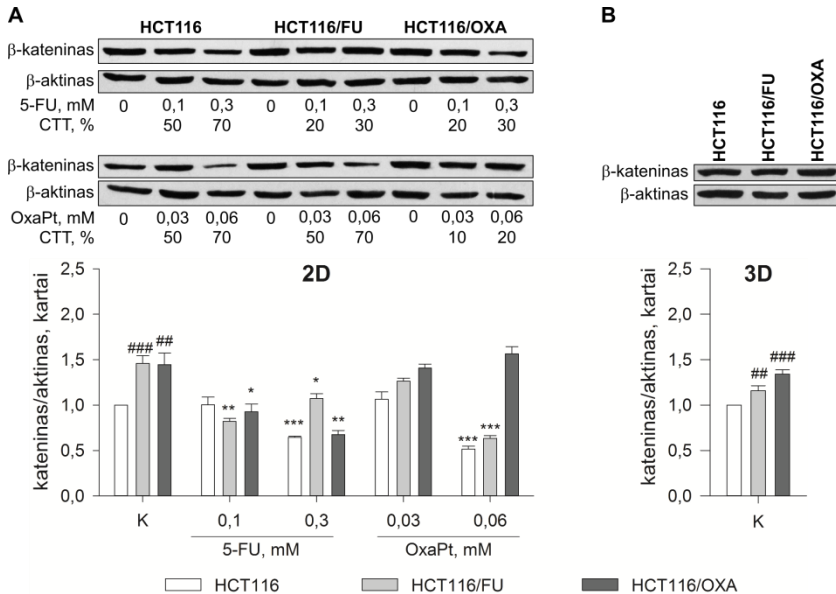
### 3.3 Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumas

Wnt signalinio kelio aktyvumą vertinome pagal S33, S37 ir T41 pozicijose nefosforilinto  $\beta$ -katenino (aktyvaus  $\beta$ -katenino) baltymo santykinį kiekį. Palyginę monosluoksniu kultūroje auginamas HCT116/FU ir HCT116/OXA ląsteles su HCT116 ląstelėmis pastebėjome, kad chemoterapiniams vaistams atsparios ląstelės turi apie 1,5 karto didesnius aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekius (atitinkamai  $p<0,001$ ,  $p=0,004$ ) (3.7 pav. A). Kontroliniai HCT116/FU sferoidai pasižymi 1,2 karto didesniu ( $p=0,018$ ), o HCT116/OXA sferoidai – 1,3 karto didesniu ( $p<0,001$ ) aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekiu negu HCT116 ląstelių sferoidai (3.7 pav. B).

Monosluoksniu kultūroje auginamose HCT116 ląstelėse santykinis aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekius sumažina tik didelės 5-FU ir OxaPt dozės (3.7 pav. A): po 0,3 mM 5-FU dozės baltymo kiekis sumažėja 36% ( $p<0,001$ ), o po 0,06 mM OxaPt dozės – 49% ( $p<0,001$ ). Abi naudotos 5-FU dozės sumažina aktyvaus  $\beta$ -katenino baltymo kiekius HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse: HCT116/FU ląstelėse 0,1 mM 5-FU sumažina šio baltymo kiekį 44% ( $p=0,002$ ), o 0,3 mM – 27% ( $p=0,012$ ). Tuo tarpu



HCT116/OXA ląstelėse 0,1 mM 5-FU sumažą aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekį 35% ( $p=0,017$ ), o 0,3 mM – 53% ( $p=0,005$ ). Tik didelė OxaPt dozė (t.y. 0,06 mM) reikšmingai veikia aktyvaus  $\beta$ -katenino baltymo kiekį HCT116/FU ląstelėse – jį sumažina 57% ( $p=0,001$ ). Nė viena iš tirtų OxaPt dozių neturėjo reikšmingo poveikio šio baltymo kiekiui HCT116/OXA ląstelėse.



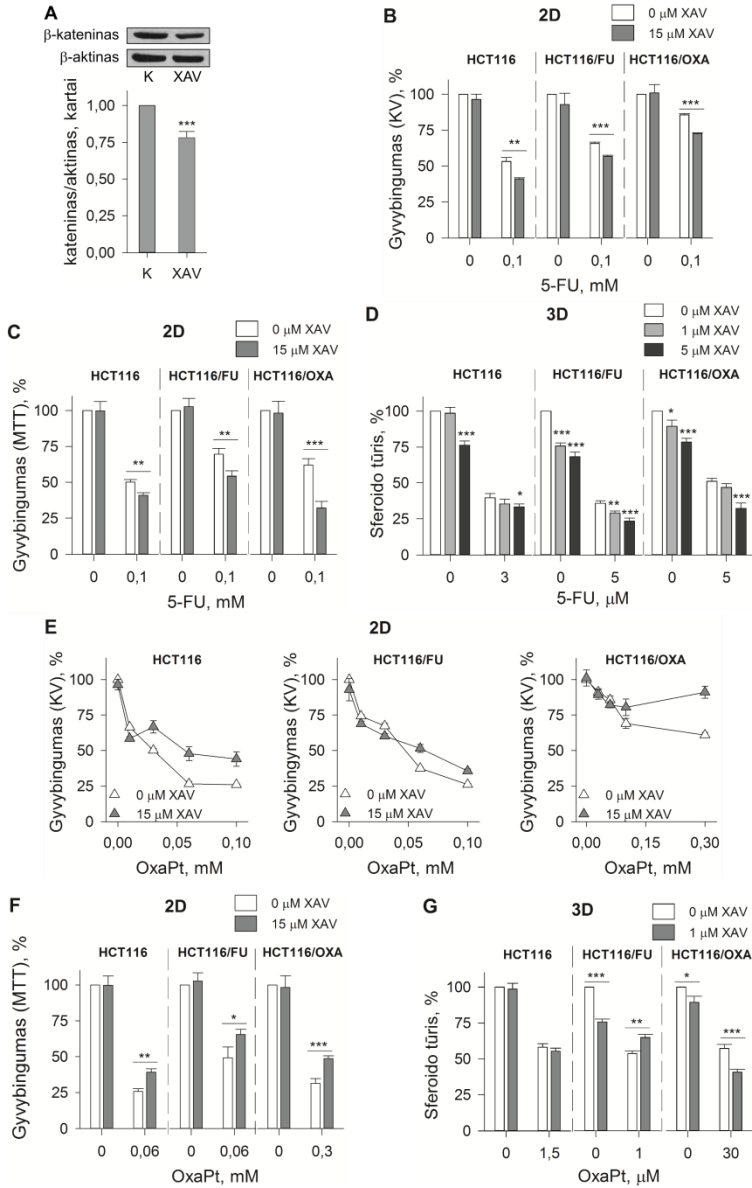
**3.7 pav. Aktyvaus  $\beta$ -katenino baltymo santykinis kiekis HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse.** A, 5-FU ir OxaPt poveikis aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekiui ląstelės kultivuojant monosluoksniu praėjus 48 val. po poveikio vaistu. B, aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekis kontroliniuose sferoiduose praėjus 168 val. po ląstelių užsėjimo. K, kontrolinės t.y. vaistu neveiktos ląstelės; brūkšniai  $\pm$ SN;  $n \geq 3$ .

#, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp HCT116/FU arba HCT116/OXA ląstelių palyginus su HCT116 ląstelėmis;

\*, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu veiktų ir kontrolinių ląstelių;

#/\*  $p < 0,05$ ; ##/\*\*  $p \leq 0,01$ ; ###/\*\*  $p \leq 0,001$ .

Toliau tyrėme ar nuo  $\beta$ -katenino priklausomo signalinio kelio slopinimas keičia 5-FU arba OxaPt citotoksiškumą ląstelėms. Tam panaudojome XAV939 (XAV), kuris slopina tankirazes, tokiu būdu sumažindamas AXIN ubiquitilinimą ir skatindamas  $\beta$ -katenino suskaidymą (Huang *et al.*, 2009b). Eksperimentus atlikome monosluoksniu ir sferoidų modeliuose pagal 2.1 pav. A ir 2.2 pav. pateiktas schemas. Monosluoksniu eksperimentuose ląstelės paveikėme XAV 24 val. prieš poveikį 5-FU arba OxaPt tam, kad vaisto pridėjimo metu nuo  $\beta$ -katenino priklausomas Wnt signalinis kelias jau būtų slopinamas. Pastebėjome, kad HCT116 ląstelėse praėjus 24 val. po 15  $\mu$ M XAV poveikio aktyvaus  $\beta$ -katenino baltymo lygis sumažėja 22%



**3.8 pav. XAV poveikis HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms.** A, aktyvaus β-katenino kiekis HCT116 ląstelėse praėjus 24 val. po 15 μM XAV pridėjimo. XAV derinio su 5-FU poveikis ląstelių gyvybingumui įvertintam KV (B), MTT (C) metodais arba santykiniam sferoido tūriui (D). XAV derinio su OxaPt poveikis ląstelių gyvybingumui įvertintam KV (E), MTT (F) metodais arba santykiniam sferoido tūriui (G). Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val., o sferoidų tūris – 120 val. po vaisto pridėjimo. Brūkšniai ±SN; n≥3.

\*, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp XAV veiktų ir neveiktų ląstelių;

\* p<0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001.

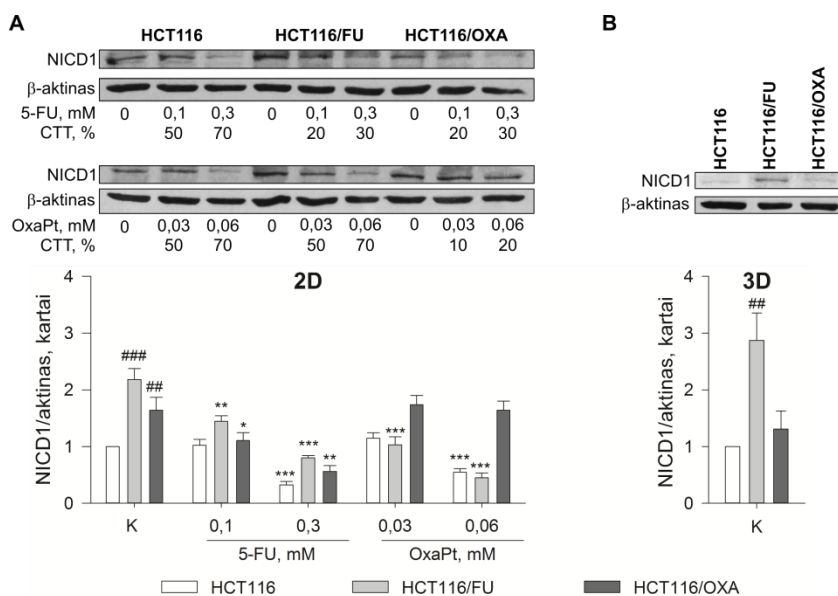
( $p < 0,001$ ) (3.8 pav. A). Panašios tendencijos stebimos ir HCT116/FU bei HCT116/OXA ląstelėse (duomenys nepateikti). Vertindami ląstelių gyvybingumą KV ir MTT metodais nustatėme, kad pavienis 15  $\mu\text{M}$  XAV poveikis nekeičia monosluoksniu kultivuojamų ląstelių gyvybingumo (3.8 pav. B, C). Tuo tarpu pavienis XAV poveikis reikšmingai sumažina sferoidų tūrį (3.8 pav. D). HCT116/FU sferoidų tūrį 1  $\mu\text{M}$  XAV sumažina 24% ( $p < 0,001$ ), o HCT116/OXA sferoidų – 11% ( $p = 0,012$ ), tačiau HCT116 sferoidų tūris išlieka nepakitęs. HCT116 sferoidų tūris sumažėja 24% ( $p < 0,001$ ) po 5  $\mu\text{M}$  XAV poveikio, HCT116/FU sferoidų – 32% ( $p < 0,001$ ), HCT116/OXA sferoidų – 21% ( $p < 0,001$ ).

Vertinant ląstelių gyvybingumą KV nustatėme, kad XAV apie 10% padidina 0,1 mM 5-FU citotoksiškumą HCT116 ( $p = 0,002$ ), HCT116/FU ( $p < 0,001$ ) ir HCT116/OXA ( $p < 0,001$ ) ląstelėms (3.8 pav. B). Panašios tendencijoms atsikartoja gyvybingumą vertinant ir MTT metodu – čia XAV padidina 5-FU citotoksiškumą apie 9% HCT116 ląstelėse ( $p = 0,003$ ), 15% HCT116/FU ląstelėse ( $p = 0,008$ ) ir 30% HCT116/OXA ląstelėse ( $p = 0,001$ ) (3.8 pav. C). 3D modelyje pastebėjome, kad 1  $\mu\text{M}$  XAV padidina 5-FU citotoksiškumą HCT116/FU sferoidams (jų tūris sumažėja 7%,  $p = 0,006$ ), bet nekeičia 5-FU citotoksiškumo HCT116 ir HCT116/OXA sferoidams (3.8 pav. D). Tuo tarpu 5  $\mu\text{M}$  XAV reikšmingai padidina 5-FU citotoksiškumą visiems sferoidams: HCT116 sferoidų tūris sumažėja 7% ( $p = 0,035$ ), HCT116/FU sferoidų – 12% ( $p = 0,001$ ), HCT116/OXA sferoidų – 19% ( $p = 0,001$ ).

XAV poveikis sumažina OxaPt citotoksiškumą HCT116 ( $p < 0,001$ ), HCT116/FU ( $p < 0,001$ ) ir HCT116/OXA ( $p < 0,001$ ) ląstelėms (3.8 pav. E). Ląstelių gyvybingumą vertinant KV metodu, XAV sumažino 0,03 mM, 0,06 mM ir 0,1 mM OxaPt dozių citotoksiškumą HCT116 ląstelėms apie 20%; 0,06 mM ir 0,1 mM OxaPt dozių – HCT116/FU ląstelėms apie 10%; 0,1 mM ir 0,3 mM OxaPt dozių – HCT116/OXA ląstelėms atitinkamai apie 10% ir 30%. Panašios tendencijos stebimos ląstelių gyvybingumą vertinant MTT metodu – 0,06 mM dozės citotoksiškumas HCT116 ląstelėms sumažėja 13% ( $p = 0,002$ ), HCT116/FU ląstelėms – 16% ( $p = 0,027$ ); o 0,3 mM dozės citotoksiškumas HCT116/OXA ląstelėms – 18% ( $p = 0,001$ ) (3.8 pav. F). Tuo tarpu sferoidų modelyje 1  $\mu\text{M}$  XAV: nekeičia OxaPt citotoksiškumo HCT116 sferoidams; sumažina OxaPt citotoksiškumą HCT116/FU sferoidams (jų tūris padidėja 11% ( $p = 0,002$ )); padidina OxaPt citotoksiškumą HCT116/OXA sferoidams (jų tūris sumažėja 16% ( $p = 0,001$ )) (3.8 pav. G).

Remiantis šiais rezultatais galima daryti kelias išvadas. Pirma, 2D modelyje aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekis HCT116/FU ir HCT116/OXA kontrolinėse ląstelėse yra reikšmingai didesnis nei HCT116 ląstelėse. Antra, 5-FU poveikis sumažina aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekį HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse. Abejuose modeliuose Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimas XAV padidina 5-FU citotoksiškumą visoms ląstelėms. Trečia, 0,06 mM OxaPt poveikis aktyvaus  $\beta$ -katenino kiekio neveikia tik HCT116/OXA ląstelėse, o HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse jį sumažina. Abejuose modeliuose XAV reikšmingai sumažina OxaPt citotoksiškumą tik HCT116/FU ląstelėms.

### 3.4 Notch1 signalinio kelio aktyvumas



**3.9 pav. NICD1 baltymo santykinis kiekis HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse.** A, 5-FU ir OxaPt poveikis NICD1 baltymo kiekiui ląsteles kultivuojant monosluoksniu praėjus 48 val. po poveikio vaistu. B, NICD1 baltymo kiekis kontroliniuose sferoiduose praėjus 168 val. po ląstelių užsėjimo. K, kontrolinės t.y. vaistu neveiktos ląstelės; brūkšniai  $\pm$ SN;  $n \geq 3$ .

#, statistškai reikšmingas skirtumas tarp HCT116/FU arba HCT116/OXA ląstelių palyginus su HCT116 ląstelėmis;

\*, statistškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu veiktų ir kontrolinių ląstelių;

##/\*  $p < 0,05$ ; ###/\*\*  $p \leq 0,01$ ; ####/\*\*\*  $p \leq 0,001$ .

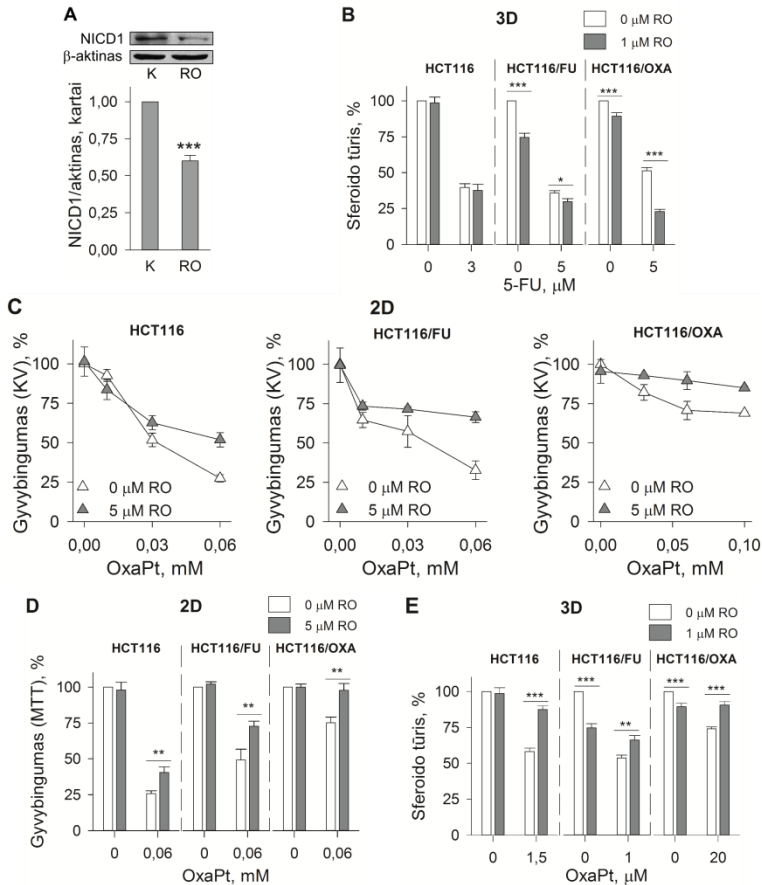
Šiame darbe Notch1 signalinio kelio aktyvumą įvertinome pagal Notch1 receptoriaus viduląstelinio domeno (NICD1) kiekį. Palyginę monosluoksniu kultūroje auginamas vaistais neveiktas HCT116 ląsteles su chemoterapiniams vaistams atspariomis ląstelėmis pastebėjome, kad NICD1 baltymo kiekis HCT116/FU ląstelėse yra 2,2 karto didesnis ( $p < 0,001$ ), o

HCT116/OXA ląstelėse 1,6 karto didesnis ( $p=0,009$ ) nei HCT116 ląstelėse (3.9 pav. A). Kontroliniai HCT116/FU sferoidai pasižymi 2,9 karto didesniu NICD1 kiekiu negu HCT116 ląstelių sferoidai ( $p=0,003$ ). Tuo tarpu HCT116/OXA sferoidus lyginant su HCT116 sferoidais, reikšmingu NICD1 baltymo kiekiu pokyčių nėra (3.9 pav. B).

HCT116 ląstelėse NICD1 kiekius reikšmingai sumažina tik didelės 5-FU ir OxaPt dozės – 0,3 mM 5-FU sumažina 68% ( $p<0,001$ ), o 0,06 mM OxaPt – 44% ( $p<0,001$ ) (3.9 pav. A). Tuo tarpu visos tirtos 5-FU ir OxaPt dozės mažina šio baltymo kiekį HCT116/FU ląstelėse: 0,1 mM 5-FU sumažina NICD1 kiekį 34% ( $p=0,004$ ), 0,3 mM 5-FU – 63% ( $p<0,001$ ), 0,03 mM OxaPt – 53% ( $p=0,001$ ), o 0,06 mM OxaPt – 79% ( $p<0,001$ ). HCT116/OXA ląstelėse nė viena iš tirtų OxaPt dozių nekeičia NICD1 kiekio. Tuo tarpu, abi naudotos 5-FU dozės keičia šio baltymo kiekį HCT116/OXA ląstelėse: 0,1 mM 5-FU sumažina NICD1 kiekį 31% ( $p=0,027$ ), o 0,3 mM 5-FU – 65% ( $p=0,002$ ).

Toliau tyrėme ar Notch signalinio kelio slopinimas keičia 5-FU arba OxaPt citotoksiškumą ląstelėms. Tuo tikslu Notch receptorių kirpimo slopinimui naudojome  $\gamma$ -sekretazės slopiklį RO4929097 (RO). Eksperimentus atlikome monosluoksniu ir sferoidų modeliuose pagal 2.1 pav. A ir 2.2 pav. pateiktas schemas. Monosluoksniu eksperimentuose ląsteles paveikėme RO 24 val. prieš poveikį 5-FU arba OxaPt tam, kad vaisto pridėjimo metu Notch signalinis kelias jau būtų slopinamas. Pastebėjome, kad HCT116 ląstelėse praėjus 24 val. po 5  $\mu$ M RO poveikio NICD1 kiekis sumažėja 40% ( $p<0,001$ ) (3.10 pav. A). Panašios tendencijos stebimos ir HCT116/FU bei HCT116/OXA ląstelėse (duomenys nepateikti). Vertindami ląstelių gyvybingumą KV ir MTT metodais nustatėme, kad pavienis 5  $\mu$ M RO poveikis neturi įtakos HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelių gyvybingumui (3.10 pav. C, D). Tuo tarpu 3D modelyje 1  $\mu$ M RO pavienis poveikis 25% sumažina HCT116/FU sferoidų tūrį ( $p<0,001$ ), 11% HCT116/OXA sferoidų tūrį ( $p=0,001$ ), bet nekeičia HCT116 sferoidų tūrio.

Pirmiausiai tyrėme kaip RO pridėjimas veikia 5-FU citotoksiškumą. Nustatėme, kad 5 ir 10  $\mu$ M RO nekeičia 5-FU citotoksiškumo monosluoksniu auginamoms HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms (duomenys nepateikti). Tuo tarpu 3D modelyje, 1  $\mu$ M RO pridėjimas padidina 5-FU vaisto citotoksiškumą chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių sferoidams: HCT116/FU sferoidų tūrį sumažina 6% ( $p=0,017$ ), o HCT116/OXA sferoidų tūrį – 28% ( $p<0,001$ ) (3.10 pav. B).



**3.10 pav. RO poveikis HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms.** A, NICD1 kiekis HCT116 ląstelėse praėjus 24 val. po 5 μM RO pridėjimo. B, 1 μM RO derinio su 5-FU poveikis sferoidų tūriui. 5 μM RO derinio su OxaPt poveikis ląstelių gyvybingumui įvertintam KV (C) arba MTT (D) metodais. E, 1 μM RO derinio su OxaPt poveikis sferoidų tūriui. Ląstelių gyvybingumas vertintas praėjus 48 val., o sferoidų tūris – 120 val. po vaisto pridėjimo. Brūkšniai ±SN; n≥3.

\*, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp RO veiktų ir neveiktų ląstelių;  
\* p<0,05; \*\* p≤0,01; \*\*\* p≤0,001.

Priešingos tendencijos stebimos RO derinant su OxaPt – 2D modelyje gyvybingumą vertinat KV metodu pastebėta, kad 5 μM RO reikšmingai sumažina OxaPt citotoksiškumą HCT116 (p<0,001), HCT116/FU (p<0,001), HCT116/OXA (p<0,001) ląstelėms (3.10 pav. C). Visosose tirtose ląstelėse RO derinys su 0,01 mM OxaPt doze nekeičia OxaPt citotoksiškumo; RO pridėjimas sumažina 0,03 mM OxaPt citotoksiškumą maždaug 10%, o 0,06 mM OxaPt dozės – daugiau negu 20%. Stipriausias efektas pastebėtas HCT116/FU ląstelėse, kur RO pridėjimas sumažina 0,06 mM OxaPt citotoksiškumą 34%. Panašios tendencijos stebimos ir ląstelių gyvybingumą vertinant MTT metodu: RO pridėjimas sumažina 0,06 mM OxaPt

citoksiškumą HCT116 ląstelėms 14% ( $p=0,005$ ), HCT116/FU ląstelėms – 24% ( $p=0,007$ ), o HCT116/OXA ląstelėms – 23% ( $p=0,003$ ). Šios tendencijos atsikartoja ir sferoidų modelyje – 1  $\mu\text{M}$  RO pridėjimas sumažina OxaPt poveikį: HCT116 sferoidų tūrį padidina 29% ( $p<0,001$ ), HCT116/FU sferoidų – 13% ( $p=0,004$ ), HCT116/OXA sferoidų – 16% ( $p<0,001$ ).

Taigi, remiantis šiais rezultatais galima daryti kelias išvadas. Pirma, abejuose modeliuose: 1) kontrolinės HCT116/FU ląstelės pasižymi didesniu NICD1 baltymo kiekiu lyginant su kontrolinėmis HCT116 ląstelėmis; 2) Notch signalinio kelio slopinimas RO sumažina OxaPt citotoksiškumą visoms tirtoms ląstelėms. Antra, į 0,3 mM 5-FU poveikį HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelės reaguoja panašiai – jose sumažėja NICD1 baltymo kiekis. Trečia, 0,06 mM OxaPt poveikis sumažina NICD1 kiekį tik HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse.

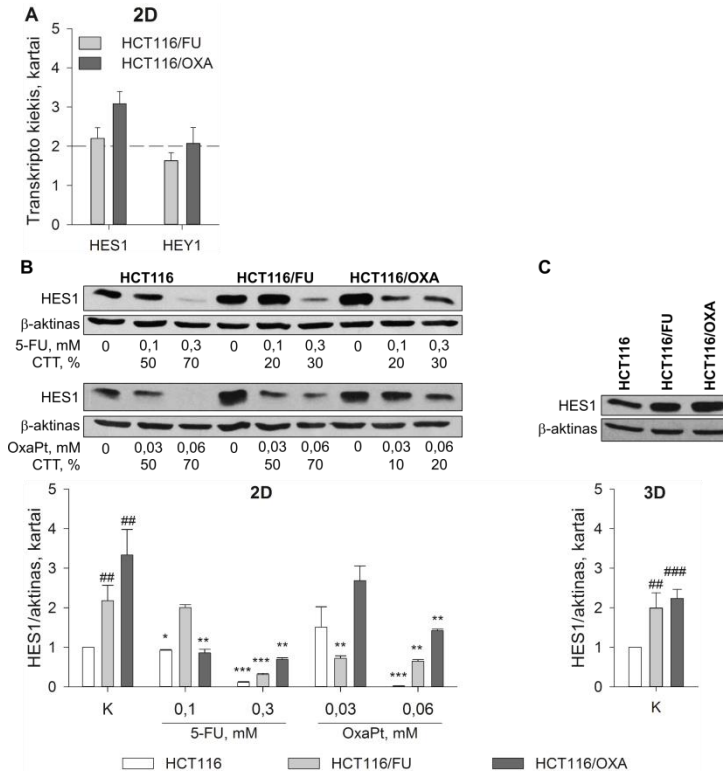
### 3.5 Transkripcijos represorius HES1

Transkripcijos represorius HES1 pirmiausiai buvo identifikuotas kaip Notch signalinio kelio taikiny (Iso *et al.*, 2002). Vėliau buvo nustatyta, kad ši baltymą koduojančio geno raišką gali skatinti ir Wnt, Hedgehog, BMP/TGF $\beta$  signaliniai keliai bei hipoksija (Borggreffe *et al.*, 2016). Palyginę *HES1* transkripto lygius kontrolinėse monosluoksnio kultūroje auginamose chemoterapiniams vaistams atspariose ląstelėse su HCT116 ląstelėmis pastebėjome, kad šio transkripto kiekiai HCT116/FU ląstelėse yra apie  $2,2\pm 0,3$  karto didesni, o HCT116/OXA ląstelėse –  $3,1\pm 0,3$  karto didesni nei HCT116 ląstelėse (3.11 pav. A). Be to, HCT116/OXA ląstelėse stebima kito Notch signalinio kelio taikinio – *HEY1* transkripto kiekio tendencija didėti, tačiau HCT116/FU ląstelėse šio transkripto kiekiai neviršija reikšmingu laikomo pokyčio slenkstinės ribos.

Auginant ląsteles monosluoksniumi, HES1 baltymo lygis kontrolinėse HCT116/FU ląstelėse yra 2,2 karto ( $p=0,006$ ), o HCT116/OXA ląstelėse – 3,3 karto didesnis ( $p=0,003$ ) nei HCT116 ląstelėse (3.11 pav. B). HES1 baltymo kiekio padidėjimas stebimas ir kontroliniuose chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių sferoiduose – HCT116/FU jis 2 kartus ( $p=0,002$ ), o HCT116/OXA – 2,2 kartus didesnis ( $p<0,001$ ) nei HCT116 sferoiduose (3.11 pav. C).

Monosluoksnio modelyje HCT116 ląsteles paveikus abiem 5-FU dozėmis ir didžiausia OxaPt doze, sumažėja HES1 santykinis baltymo kiekis: 0,1 mM 5-FU sumažina šio baltymo kiekį 8% ( $p=0,03$ ), 0,3 mM FU – 89% ( $p<0,001$ ), o po 0,06 mM OxaPt poveikio HES1 baltymas beveik nedetektuojamas ( $p<0,001$ ) (3.11 pav. B). Tuo tarpu HCT116/FU ląstelėse

šio baltymo kiekį sumažina didelė 5-FU dozė ir abi OxaPt dozės: po 0,3 mM 5-FU šis kiekis sumažėja 86% ( $p=0,001$ ), po 0,03 mM OxaPt – 67% ( $p=0,003$ ), po 0,06 mM OxaPt – 71% ( $p=0,002$ ). HCT116/OXA ląstelėse HES1 baltymo kiekį sumažina abi 5-FU dozės ir didžiausia OxaPt dozė: 0,1 mM 5-FU sumažina šio baltymo kiekį 74% ( $p=0,003$ ), 0,3 mM 5-FU – 79% ( $p=0,002$ ), 0,06 mM OxaPt – 57% ( $p=0,007$ ).



**3.11 pav. HES1 ir HEY1 santykiniai kiekiai HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse.** A, HES1 ir HEY1 transkriptų santykiniai kiekiai HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse palyginus su HCT116 ląstelėmis. B, 5-FU ir OxaPt poveikis HES1 baltymo kiekiui ląsteles kultivuojant monosluoksniu praėjus 48 val. po poveikio vaistu. C, HES1 baltymo kiekis kontroliniuose sferoiduose praėjus 168 val. po ląstelių užsėjimo. K, kontrolinės t.y. vaistu neveiktos ląstelės; punktyrinė linija – reikšmingu laikomo pokyčio slenkstinė riba; brūkšniai  $\pm$ SN;  $n \geq 3$ .

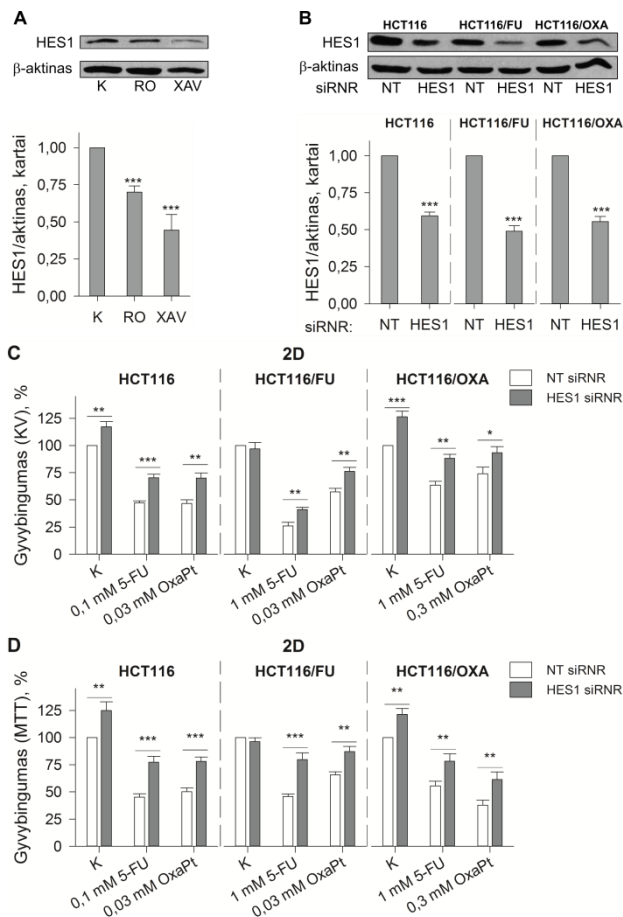
#, statistškai reikšmingas skirtumas tarp HCT116/FU arba HCT116/OXA ląstelių palyginus su HCT116 ląstelėmis;

\*, statistškai reikšmingas skirtumas tarp vaistu veiktų ir kontrolinių ląstelių;

##/ \*  $p < 0,05$ ; ###/ \*\*  $p < 0,01$ ; ####/ \*\*\*  $p < 0,001$ .

Įvertinome kaip HES1 baltymo kiekio sumažinimas veikia 5-FU arba OxaPt citotoksiškumą HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėms. Nustatėme, kad monosluoksniu kultivuojamose HCT116 ląstelėse Notch ir





**3.12 pav. HES1 slopinimo poveikis HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms.** A, 5  $\mu$ M RO arba 15  $\mu$ M XAV poveikis HES1 baltymo kiekiui HCT116 ląstelėse praėjus 24 val. po slopiklio pridėjimo. B, HES1 siRNR įtaka HES1 baltymo kiekiui praėjus 48 val. po siRNR transfekcijos. HES1 siRNR derinių su 5-FU arba OxaPt įtaka ląstelių gyvybingumui vertinant KV (C) arba MTT (D) metodais. Ląstelės buvo transfekuotos HES1 siRNR arba NT siRNR 24 val. prieš poveikį vaistu. Ląstelių gyvybingumas įvertintas praėjus 48 val. po poveikio vaistu. Brūkšniai  $\pm$ SN; n $\geq$ 3.

\*, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp slopiklio arba HES1 siRNR veiktų ir neveiktų ląstelių;

\* p<0,05; \*\* p $\leq$ 0,01; \*\*\* p $\leq$ 0,001.

Wnt signalinių kelių slopinimas sumažina HES1 baltymo kiekį: praėjus 24 val. po 5  $\mu$ M RO pridėjimo jis sumažėjo 30% (p<0,001), o po 15  $\mu$ M XAV – 56% (p<0,001) (3.12 pav. A). Norėdami savitai sumažinti HES1 baltymo raišką naudojome tokias ląstelių transfekcijos su HES1 savita siRNR (HES1 siRNR) sąlygas, kad HES1 baltymo kiekis visose ląstelių linijose sumažėtų panašiai: praėjus 48 val. po ląstelių transfekcijos HES1 baltymo kiekis sumažėja apie 40% HCT116 ląstelėse (p<0,001), apie 50% HCT116/FU ląstelėse (p<0,001) ir apie 45% HCT116/OXA ląstelėse

( $p < 0,001$ ) (3.12 pav. B). HES1 nutildymo poveikį 5-FU ir OxaPt citotoksiškumui tyrėme pagal 2.4 pav. pateiktą schemą. KV ir MTT metodais įvertinę ląstelių gyvybingumą pastebėjome, kad HES1 baltymo kiekio sumažinimas HES1 siRNR apie 20% padidina vaistu neveiktų HCT116 (KV  $p = 0,004$ ; MTT  $p = 0,005$ ) ir HCT116/OXA (KV  $p < 0,001$ ; MTT  $p = 0,003$ ) ląstelių gyvybingumą (3.12 pav. C, D). Be to, ląstelių transfekcija su HES1 siRNR sumažina visų tirtų ląstelių linijų jautrumą 5-FU bei OxaPt: HCT116 ląstelėse 5-FU ir OxaPt citotoksiškumas sumažėja apie 30% gyvybingumą vertinant KV metodu (5-FU  $p < 0,001$ ; OxaPt  $p = 0,002$ ) bei apie 20% vertinant MTT metodu (5-FU  $p < 0,001$ ; OxaPt  $p < 0,001$ ); HCT116/FU ląstelėse – vertinant KV metodu apie 20% (5-FU  $p = 0,003$ ; OxaPt  $p = 0,003$ ), tuo tarpu vertinant MTT metodu 5-FU citotoksiškumas sumažėja 34% ( $p < 0,001$ ), o OxaPt – 20% ( $p = 0,002$ ); HCT116/OXA ląstelėse 5-FU ir OxaPt citotoksiškumas sumažėja 20% gyvybingumą vertinant abiem metodais (5-FU: KV  $p = 0,001$  ir MTT  $p = 0,008$ ; OxaPt: KV  $p = 0,015$  ir MTT  $p = 0,008$ ). Šios tendencijos atsikartoja ląsteles transfekuojuojant ON-TARGETplus HES1 SMARTpool siRNR, kuris HES1 baltymo lygį visose ląstelių linijose sumažina apie 80% (duomenys nepateikti).

Taigi, remiantis šiais rezultatais galima daryti kelias išvadas. Pirma, abejuose modeliuose kontrolinės HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelės pasižymi didesniu HES1 baltymo kiekiu nei kontrolinės HCT116 ląstelės; Antra, 0,3 mM 5-FU ir 0,06 mM OxaPt sumažina HES1 baltymo kiekį visose tirtose ląstelėse. Trečia, HES1 baltymo kiekio sumažinimas siRNR sumažina 5-FU ir OxaPt citotoksiškumą visoms tirtoms ląstelėms.

#### 4. DISKUSIJA

Šiame darbe tyrėme Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių bei autofagijos reikšmę žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelių HCT116 bei mūsų laboratorijoje išvestų chemoterapiniams vaistams atsparių HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių atsakui į citotoksinį poveikį. Citotoksinis poveikis buvo sukeltas kolorektalinės karcinomos gydyme naudojamais chemoterapiniais vaistais 5-FU, OxaPt arba fotodinaminėje terapijoje naudojamu fotosensibilizatoriumi mTHPC, kuris buvo aktyvuojamas  $660\pm 5$  nm šviesa. Prieš atliekant molekulinis ląstelių atsako į citotoksinį poveikį matavimus palyginome HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių jautrumą 5-FU arba OxaPt poveikiams. Nustatėme, kad 2D ir 3D ląstelių kultūrose auginamos HCT116/FU ląstelės yra atsparios 5-FU poveikiui. Tuo tarpu HCT116/OXA ląstelės yra atsparios 5-FU ir OxaPt poveikiams. Atsparumą chemoterapiniams vaistams gali lemti įvairūs molekuliniai pokyčiai, ribojantys vaisto veikimą. Šiuo metu gerai žinoma, kad įgytas atsparumas 5-FU dažnai yra lemiamas jo išnašos iš ląstelės padidėjimo, metabolinei jo aktyvacijai reikalingų fermentų raiškos sumažėjimo arba tiesioginio jo taikinio – timidilato sintazės mutacijų bei raiškos padidėjimo (Longley ir Johnston, 2005; Temraz *et al.*, 2014; Jensen *et al.*, 2012). Tuo tarpu įgytas atsparumas OxaPt dažnai siejamas su didesniais antioksidantų, glutationo, metalotioneinų kiekiais bei intensyvesniu DNR pažaidų taisymu iškerpant nukleotidus (Jensen *et al.*, 2012). Taip pat dažnai stebimas fenomenas – ko-atsparumas vaistams – t.y. fenotipas, kai vienam vaistui įgijusios atsparumą ląstelės tampa atsparesnės kitu būdu veikiančiam vaistui. Skirtingą atsparumą turinčių ląstelių atsako į vaistą metu vykstančių procesų palyginimas bei šių procesų reikšmės vaisto citotoksiškumui nustatymas galėtų atskleisti kurie iš šių procesų yra svarbūs ląstelių atsparumui.

Palyginę regresinės analizės metu nustatytas šių vaistų  $IC_{50}$  dozes pastebėjome, kad ląstelių atsparumo laipsniai 2D ir 3D ląstelių kultūrose skiriasi: ląstelių atsparumo 5-FU laipsniai 3D modelyje yra mažesni nei ląsteles auginant 2D, o ląstelių atsparumo OxaPt laipsniai 3D modelyje – didesni nei ląsteles auginant 2D. Šiuos skirtumus būtų galima paaiškinti tuo, kad 5-FU veikia tik besidalinančias ląsteles, todėl negali nužudyti ramybės būsenoje esančių sferoido ląstelių (Tung *et al.*, 2011). Tuo tarpu OxaPt veikia ir ramybės būsenoje esančias ląsteles. Be to, sferoido viduje susidariusios hipoksinės sąlygos gali padidinti ląstelių atsparumą OxaPt (Roberts *et al.*, 2009).

Vis daugėja tyrimų, rodančių fotodinaminio poveikio veiksmingumą prieš chemoterapiniams vaistams atsparias ląsteles (Spring *et al.*, 2015). Nustatėme, kad HCT116 ir HCT116/FU ląstelės prikaupia panašius mTHPC kiekius. Be to, abiejų ląstelių linijų jautrumas mTHPC-FDP yra panašus. Vadinasi HCT116/FU ląstelės nėra įgijusios atsparumo mTHPC-FDP, kuris dažniausiai siejamas su padidėjusiu mTHPC iš ląstelių gebančio pašalinti ABCG2 nešiklio kiekiu (Liu *et al.*, 2007). FDP veiksmingumas prieš 5-FU atsparias ląsteles taip pat buvo parodytas stemplės plokščiųjų ląstelių karcinomos atveju naudojant fotosensibilizatorių NPe6 (Ohashi *et al.*, 2014). Be to, mūsų duomenys parodė, kad mTHPC-FDP derinys su 5-FU yra veiksmingas prieš HCT116 ląsteles – ir FDP, ir 5-FU buvo svarbios determinantės šio derinio citotoksiškumui. Visgi, HCT116/FU ląstelėse šis derinys yra mažiau veiksmingas, o 5-FU pridėjimas derinio citotoksiškumui neturi reikšmės. Taigi, nors FDP yra veiksmingas prieš chemoterapiniams vaistams atsparias ląsteles, jis nekeičia įgyto ląstelių atsparumo 5-FU. Adityvus FDP ir chemoterapinių vaistų poveikis taip pat pastebėtas įvairiose ląstelių linijose: AIPcS2a-FDP sustiprino 5-FU toksiškumą gliomos F98 ląstelėms (Christie *et al.*, 2017), HpD-FDP sustiprino 5-FU arba cisplatinos toksiškumą paviršinės stemplės plokščiųjų ląstelių karcinomos OE21 ląstelėms (Kawazoe *et al.*, 2010), BPD-FDP sustiprino gemcitabino toksiškumą kepenų vėžio ląstelių linijoms (Celli *et al.*, 2011).

Norėdami įvertinti konkretaus signalinio kelio arba proceso svarbą chemoterapiniams vaistams jautrioms ir atsparioms ląstelėms pasirinkome dvi strategijas. Pirmiausiai vertinome signalinio kelio arba proceso aktyvaciją rodančių baltymų raišką. Autofagosomų susidarymas buvo vertinamas pagal autofagosomų augimui svarbaus baltymo ATG7 ir su autofagosomų kiekiu koreliuojančio LC3B-II baltymo kiekius. Autofagijos vyksmo efektyvumas (t.y. autofagijos srautas, kuris parodo ar susidariusios autofagosomos yra suskaidomos lizosomose) buvo nustatytas palyginus momentinį autofagosomų kiekį su bendru autofagosomų kiekiu stebimu autofagosomų skaidymą lizosomose nuslopinus CQ. Kanoninio Wnt signalinio kelio aktyvumas buvo vertinamas pagal S33, S37 ir T41 pozicijose nefosforilinto  $\beta$ -katenino (aktyvaus  $\beta$ -katenino) baltymo kiekį. Notch signalinio kelio aktyvacija vertinta pagal Notch1 receptoriaus viduląstelinio domeno (NICD1) kiekį. Taip pat įvertinome Wnt ir Notch signalinių kelių taikinio HES1 baltymo kiekį. Siekdami įvertinti funkcinę šių kelių reikšmę atsparumui tyrėme kaip keičiasi ląstelių gyvybingumas slopinant šiuos signalinius kelius/procesus slopikliais arba siRNR. Wnt signalinis kelias buvo slopintas tankirazių slopikliu XAV. Notch signalinis

kelias slopintas  $\gamma$ -sekretazės slopikliu RO. HES1 bei ATG7 baltymų kiekis sumažintas jiems savitomis siRNR.

**4.1 lentelė. Wnt/ $\beta$ -katenino, Notch1 signalinių kelių aktyvacija ir autofagijos intensyvumas HCT116/FU bei HCT116/OXA ląstelėse palyginus su HCT116 ląstelėmis**

Baltymas	Modelis	Ląstelių linija	
		HCT116/FU	HCT116/OXA
aktyvus $\beta$ -kateninas	2D	↑	↑
	3D	↑	↑
NICD1	2D	↑	↑
	3D	↑	-
HES1	2D	↑	↑
	3D	↑	↑
LC3B-II	2D	↑	↓
ATG7	2D	↑	↑

↑/↓, baltymo kiekio padidėjimas/sumažėjimas, kuris didesnis arba lygus 1,5 karto;

↑/↓, statistiškai reikšmingas baltymo kiekio padidėjimas/sumažėjimas, kuris mažesnis nei 1,5 karto

Nustatėme, kad chemoterapiniams vaistams atsparios HCT116/FU ląstelės pasižymi didesniu autofagosomų kiekiu, o HCT116/OXA ląstelės – mažesniu autofagosomų kiekiu nei HCT116 ląstelės (4.1 lentelė). Įdomu tai, kad kitų autorių tyrimuose 5-FU atsparioms kolorektalinės karcinomos ląstelėms SNUC5 būdingas šiek tiek mažesnis autofagosomų kiekis (Yao *et al.*, 2017), o OxaPt atsparioms HT29 ląstelėms – didesnis autofagosomų kiekis (Sun *et al.*, 2017a). Be to, kontrolinėms HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelėms būdingas panašus bazinis autofagijos srautas – t.y. visose tirtose ląstelėse vyksta panašaus intensyvumo autofagosomų skaidymas. ATG7 baltymo raiškos sumažinimas siRNR parodė, kad autofagija slopina HCT116 ir HCT116/OXA ląstelių proliferaciją. Žinoma, kad esant aktyviai autofagijai AMBRA1 baltymas skatina PP2A fosfatazės vykdomą c-Myc defosforilinimą, tokiu būdu sumažindamas c-Myc baltymo stabilumą bei slopindamas ląstelių proliferaciją (Cianfanelli *et al.*, 2015).

Mūsų duomenys rodo, kad chemoterapiniams vaistams atspariose HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse yra padidėjusi Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvacija. Didesnė Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvacija stebima 5-FU atspariose HCT8 (He *et al.*, 2018) ir HT29 ląstelėse (Ayadi *et al.*, 2015). Mūsų naudotos tankirazių slopiklio XAV dozės sumažina aktyvaus  $\beta$ -katenino ir HES1 baltymo kiekius HCT116 ląstelėse. Tai rodo, kad šis slopiklis tikrai slopina Wnt/ $\beta$ -katenino signalinį kelią, o HES1 baltymo kiekis bent jau iš dalies priklauso nuo šio signalinio kelio. Svarbu paminėti, kad XAV turėjo nestiprų poveikį  $\beta$ -katenino kiekiui. Tai galima paaiškinti tuo, kad HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse

CTNNB1 koduojančiame gene yra stebima heterozigotinė 131-133 pozicijoje esančio CTT delecija (A. Laurinavičiaus ir jo kolegų nepublikuoti duomenys). Dėl šios mutacijos dalis ląstelėse sintetinamo  $\beta$ -katenino nebeturi S45 (šios padėties fosforilinimas svarbus  $\beta$ -katenino ubikvitilinizacijai ir destrukcijai; žiūrėti 1.3.1 skyrių). Tai reiškia, kad destrukcijos kompleksas negali nukreipti dalies ląstelėse esančio  $\beta$ -katenino suskaidymui. Nepaisant to, kitų autorių tyrimai parodė, kad HCT116 ląstelių stimuliacija WNT3A ligandu padidina Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumą – padidėja  $\beta$ -katenino baltymo kiekis ir TCF/LEF promotoriaus aktyvacija (Wu *et al.*, 2012). Slopindami Wnt/ $\beta$ -katenino signalinį kelią pastebėjome, kad 15  $\mu$ M XAV dozė neturi įtakos HCT116, HCT116/FU bei HCT116/OXA ląstelių gyvybingumui ląsteles auginant 2D kultūroje, o 3D kultūroje naudota 1  $\mu$ M XAV dozė sumažina HCT116/FU ir HCT116/OXA sferoidų tūrį. Įdomu tai, kad S45 neturintis  $\beta$ -kateninas neturi didelės įtakos HCT116 ląstelių proliferacijai – šio  $\beta$ -katenino išmušimas nepakeitė ląstelių dalijimosi greičio stebimo 2D ląstelių kultūroje (Sekine *et al.*, 2002) bei neturėjo įtakos ląstelių gebai formuoti navikus pelėse, kurių imuninė sistema yra nuslopinta (Kim *et al.*, 2002). Didesnis chemoterapiniams vaistams atsparių HCT116/FU ir HCT116/OXA sferoidų jautrumas XAV galėtų byloti apie šiose ląstelėse įvykusius pokyčius, kurie padidino ląstelių proliferacijos priklausomybę nuo Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio.

2D ir 3D kultūrose auginamose chemoterapiniams vaistams atspariose HCT116/FU ląstelėse stebimas didesnis NICD1 baltymo kiekis nei HCT116 ląstelėse. Tai rodo, kad HCT116/FU ląstelėse yra padidėjusi Notch1 receptoriaus aktyvacija. Tuo tarpu HCT116/OXA ląstelėse didesni NICD1 kiekiai stebimi tik 2D ląstelių kultūroje. Kitų autorių tyrimuose nustatyta, kad 5-FU atsparioms HCT8 ląstelėms bei 5-FU arba OxaPt atsparioms HCT116 ląstelėms būdingi didesni Notch1 receptoriaus kiekiai (Dinicola *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2015). Mūsų naudotos  $\gamma$ -sekretazės slopiklio RO dozės sumažina NICD1 ir HES1 baltymų kiekius – t.y. slopina Notch signalinį kelią. Be to, RO poveikis neturi įtakos HCT116, HCT116/FU bei HCT116/OXA ląstelių gyvybingumui ląsteles auginant 2D kultūroje, bet sumažina HCT116/FU ir HCT116/OXA sferoidų tūrį. Tai galėtų rodyti, kad sferoidų kultūroje auginamų chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių proliferacija yra labiau priklausoma nuo Notch signalinio kelio. Panašūs rezultatai buvo pastebėti ir kitų autorių tyrime, kur  $\gamma$ -sekretazės slopiklis DAPT stipriau slopino navikų, gautų pelėms įskiepijus 5-FU arba OxaPt atsparias HCT116 ląsteles, augimą (Huang *et al.*, 2015).

Nustatėme, kad chemoterapiniams vaistams atsparioms HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms būdingas didesnis HES1 baltymo kiekis nei HCT116 ląstelėms. Panašūs rezultatai taip pat buvo pastebėti ir kitų autorių tyrime (Huang *et al.*, 2015). Mūsų rezultatai parodė, kad HES1 baltymo raiškos sumažinimas siRNR skatina HCT116 ir HCT116/OXA ląstelių proliferaciją. HES1 raiškos sumažinimo lemiamas ląstelių proliferacijos padidėjimas galėtų būti susijęs su sumažėjusiu ląstelių jautrumu ląstelių kontakto lemiamam dalijimosi slopinimui. Toks efektas buvo pastebėtas preadipocitų tyrimų metu, kur HES1 raiškos sumažinimas shRNR lėmė sumažėjusį ląstelių jautrumą kontakto lemiamam slopinimui ir skatino tolesnę ląstelių proliferaciją net ir ląstelėms užpildžius visą kultivavimo indo paviršių (Noda *et al.*, 2011).

5-FU poveikis slopina autofagiją HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse: sumažėja ATG7 baltymo kiekis, autofagosomų kiekis bei slopinamas autofagijos srautas (4.2 lentelė). Įdomu tai, kad HCT116/OXA ląstelėse po poveikio 5-FU autofagija slopinama silpniau: nors autofagosomų kiekis padidėja, sumažėja ATG7 baltymo kiekis ir autofagijos srautas. Dėsninga, kad autofagosomų elongacijai vieno svarbiausių baltymo ATG7 kiekio sumažėjimas koreliuoja su autofagijos srauto sumažėjimu. Be to, iš literatūros žinoma, kad padidėjęs ATG7 baltymo kiekis gali skatinti autofagijos srautą (Pattison *et al.*, 2011). Mūsų rezultatus paremia kitų autorių tyrimai, kuriuose 5-FU poveikis sumažino autofagosomų kiekį SNUC5 ląstelėse (Yao *et al.*, 2017), o HCT116 ląstelėse sumažino ATG7, p62 ir BECLIN1 baltymų kiekius bei autofagijos srautą (Akpınar *et al.*, 2016). Visgi, reikėtų atkreipti dėmesį, kad 5-FU poveikis autofagosomų kiekiui gali priklausyti ir nuo ląstelių linijos. Pavyzdžiui, kolorektalinės karcinomos WiDR ir Lovo92 ląstelių linijose 5-FU veikė priešingai ir padidino autofagosomų kiekį (Bijnsdorp *et al.*, 2010). Mūsų duomenys rodo, kad ATG7 baltymo kiekio sumažinimas siRNR neveikia ląstelių atsparumo 5-FU (4.3 lentelė).

OxaPt poveikis sustiprina HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse vykstančią autofagiją. HCT116 ir HT116/FU ląstelėse praėjus 48 h po OxaPt poveikio sumažėja autofagosomų kiekis, ATG7 baltymo kiekis, o autofagijos srautas išlieka reikšmingas. Tuo tarpu HCT116/OXA ląstelėse OxaPt poveikis padidina autofagosomų kiekį, ATG7 baltymo kiekį bei autofagijos srautą. Be to, ATG7 baltymo raiškos sumažinimas siRNR sumažina OxaPt citotoksiškumą HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms. Tai rodytų, kad po OxaPt poveikio autofagija skatinama ir gali turėti neigiamą įtaką ląstelių išgyvenimui. Kitų autorių tyrimuose pastebėta,

4.2 lentelė. 5-FU arba OxaPt poveikis Wnt/ $\beta$ -katenino, Notch1 signalinių kelių aktyvacijai ir autofagijos intensyvumui

Ląstelių linija	Vaistas	Koncentracija	aktyvus $\beta$ -kateninas	NICD1	HES1	LC3B-II	Autofagijos srautas	ATG7
<b>HCT116</b>	5-FU	0,1 mM	-	-	↓	↓	-	↓
		0,3 mM	↓	↓	↓	-	N	↓
	OxaPt	0,03 mM	-	-	-	↓	↑	↓
		0,06 mM	↓	↓	↓	↑	-	↓
<b>HCT116/FU</b>	5-FU	0,1 mM	↓	↓	-	↓	N	↓
		0,3 mM	↓	↓	↓	↓	N	↓
	OxaPt	0,03 mM	-	↓	↓	↓	↑	↓
		0,06 mM	↓	↓	↓	-	N	↓
<b>HCT116/OXA</b>	5-FU	0,1 mM	↓	↓	↓	-	↓	-
		0,3 mM	↓	↓	↓	↑	↓	↓
	OxaPt	0,03 mM	-	-	-	↑	-	↑
		0,06 mM	-	-	↓	↓	↑	↑

-, nėra statistiškai reikšmingo pokyčio;

↑/↓, baltymo kiekio padidėjimas/sumažėjimas, kuris didesnis arba lygus 1,5 karto;

↑/↓, statistiškai reikšmingas baltymo kiekio padidėjimas/sumažėjimas, kuris mažesnis nei 1,5 karto;

N, autofagijos srautas nereikšmingas



kad OxaPt poveikis padidina autofagosomų kiekį: HT116, HT29, SW480 ir SW620 ląstelėse praėjus 24 h po OxaPt poveikio (Liu *et al.*, 2015a; Yang *et al.*, 2015), HT29 ir HT29/OXA ląstelėse praėjus 48 h po OxaPt poveikio (Sun *et al.*, 2017a). Visgi, autofagijos slopinimas shATG5 arba shATG7 sustiprino OxaPt citotoksiškumą SW480 ir SW620 ląstelėms (Yang *et al.*, 2015).

Žinoma, kad autofagija suintensyvėja ankstyvajame ląstelių atsake į fotopazaidas – tokiu būdu ji geba izoliuoti ir suskaidyti pažeistas organeles. Be to intensyvesne autofagija pasižyminčios ląstelės galėtų apsaugoti nuo fototoksiškumo (Kessel ir Evans, 2016; Kessel, 2015). Šiame darbe mes parodėme, kad mTHPC-FDP stipriai padidina autofagosomų kiekį HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse, tačiau stipresnės FDP dozės lemia sutrikusį autofagosomų skaidymą. Iš literatūros duomenų yra žinoma, kad mTHPC gali būti kaupiamas lizosomų membranose (Leung *et al.*, 2002), tad autofagosomų skaidymo sutrikimai galėtų būti susiję su lizosomų fotopazaidomis, dėl kurių išauga lizosomų pH ir susilpnėja lizosomų proteazių aktyvumas (Kessel *et al.*, 2012). HCT116 ląstelėse 5-FU pridėjimas skatina po mTHPC-FDP stebimą autofagijos srautą, bet sumažina autofagosomų kiekį. Mažas autofagosomų kiekis ir intensyvus autofagijos srautas rodo, kad autofagijos procesas yra efektyvus: greitai suskaidomos susidarę autofagosomos. Tuo tarpu HCT116/FU ląstelėse 5-FU slopina mTHPC-FDP sukeltą autofagijos srautą ir padidina autofagosomų kiekį. Taigi, HCT116 ląstelėse 5-FU derinyje su mTHPC-FDP autofagijos srautą veikia priešingai negu pavienis 5-FU.

Po 5-FU poveikio HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse sumažėjo Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvacija. Das *et al.* tyrime buvo pastebėta, kad HCT116 ir HT29 ląstelių linijose 5-FU poveikis skatino APC baltymo raišką (Das *et al.*, 2014). Kadangi APC baltymas įeina į  $\beta$ -katenino destrukcijos komplekso sudėtį (Tortelote *et al.*, 2017), šio baltymo raiškos padidėjimas po 5-FU poveikio galėtų lemti Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimą. Svarbu paminėti, kad kai kuriose kolorektalinės karcinomos ląstelių linijose 5-FU turi priešingą poveikį Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumui – pavyzdžiui, HCT8 ląstelių linijoje 5-FU poveikis skatina šį signalinį kelią (He *et al.*, 2018). Nustatėme, kad Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimas tankirazių slopikliu XAV sustiprino 5-FU citotoksiškumą HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių linijoms auginamoms 2D ląstelių kultūrose bei HCT116/FU sferoidams. Tai rodo, kad Wnt/ $\beta$ -katenino signalinis kelias padidina ląstelių atsparumą 5-FU poveikiui ir skatina ląstelių išgyvenimą. Panašus efektas buvo pastebėtas kolorektalinės

karcinomos SW480 ir SW620 ląstelių linijose, kuriose XAV sustiprino 5-FU sukliamą apoptozę (Wu *et al.*, 2016c).

Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvacija po OxaPt poveikio sumažėjo tik OxaPt poveikiui neatspariose HCT116 ir HCT116/FU ląstelėse. Yang *et al.* tyrime HCT116 ląstelėse Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio aktyvumo sumažėjimas po OxaPt poveikio buvo lemiamas  $\beta$ -katenino geno raiškos sumažėjimo ir priklausė nuo p53 (Yang *et al.*, 2016a). Wnt signalinio kelio slopinimas XAV sumažino OxaPt citotoksiškumą HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėms auginamoms 2D ląstelių kultūroje. Šiuos rezultatus paremia Yang *et al.* atliktas priešingas eksperimentas, kuriame  $\beta$ -katenino raiškos padidėjimas sustiprino OxaPt citotoksiškumą HCT116 ląstelėms (Yang *et al.*, 2016a). Mūsų duomenimis 3D ląstelių kultūroje XAV veikė OxaPt citotoksiškumą tik chemoterapiniams vaistams atspariose ląstelėse ir priklausė nuo ląstelių linijos: HCT116/FU ląstelėse šio vaisto citotoksiškumas sumažėjo (t.y. stebimas toks pats efektas kaip ir 2D ląstelių kultūroje), HCT116/OXA ląstelėse – citotoksiškumas padidėjo (t.y. stebimas priešingas efektas nei 2D ląstelių kultūroje). Tai reiškia, kad HCT116/FU ląstelėse Wnt/ $\beta$ -katenino signalinis kelias skatina ląstelių žūtį po OxaPt poveikio. Gali būti, kad HCT116/OXA ląstelėse šio signalinio kelio reikšmė ląstelių išgyvenimui/žūčiai po OxaPt poveikio priklauso nuo ląstelių kultivavimo sąlygų – normoksijos sąlygomis Wnt/ $\beta$ -katenino signalinis kelias skatina ląstelių žūtį (2D kultūra), o esant hipoksijai (3D kultūra) – išgyvenimą. Dong *et al.* tyrime buvo parodyta, kad kai kuriose kolorektalinės karcinomos ląstelių linijose hipoksija aktyvuoja Wnt/ $\beta$ -katenino signalinį kelią ir skatina ID2 baltymo raišką. Šio baltymo raiškos sumažinimas naudojant shRNR parodė, kad ID2 kolorektalinės karcinomos ląstelėse gali slopinti apoptozę bei skatinti ląstelių migraciją. Be to, Wnt/ $\beta$ -katenino signalinio kelio slopinimas sumažina šio baltymo raišką (Dong *et al.*, 2016).

Mūsų duomenys rodo, kad HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse 5-FU poveikis sumažino Notch1 receptoriaus aktyvaciją. Notch signalinio kelio slopinimas  $\gamma$ -sekretazės slopikliu RO sustiprino 5-FU citotoksiškumą tik HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių sferoidams ir neturėjo įtakos 5-FU citotoksiškumui ląstelėse kultivuojant 2D ląstelių kultūroje. Tai rodo, kad HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelių sferoiduose Notch signalinis kelias galėtų padidinti ląstelių atsparumą 5-FU. Be to, nustatėme, kad HCT116, HCT116/FU ir HCT116/OXA ląstelėse 5-FU poveikis sumažina HES1 baltymo kiekį. Tai bent iš dalies koreliuoja su

sumažėjusių Wnt ir Notch signalinių kelių aktyvumu. Visgi, negalime atmesti galimybės, kad HCT116 ir chemoterapiniams vaistams atspariose sublinijose HES1 baltymo kiekis veikiamas ne vien tik šių signalinių kelių. Įdomu tai, kad HES1 raiškos sumažinimas siRNR padidino visų tirtų ląstelių linijų atsparumą 5-FU poveikiui, t.y. veikė kitaip nei XAV arba RO. Būtų galima iškelti hipotezę, kad XAV bei RO lemiamas 5-FU citotoksiškumo padidėjimas labiau priklauso ne nuo HES1 raiškos sumažėjimo, bet kitų Wnt bei Notch taikinių pokyčių.

**4.3 lentelė. Wnt/ $\beta$ -katenino, Notch signalinių kelių slopiklių, HES1 arba ATG7 baltymų raišką sumažinančių siRNR poveikis 5-FU arba OxaPt citotoksiškumui**

Slopiklis arba siRNR	Vaistas	Modelis	Ląstelių linija		
			HCT116	HCT116/FU	HCT116/OXA
XAV	K	2D	-	-	-
		3D	-	T	T
	5-FU	2D	↑	↑	↑
		3D	-	↑	-
	OxaPt	2D	↓	↓	↓
		3D	-	↓	↑
RO	K	2D	-	-	-
		3D	-	T	T
	5-FU	2D	-	-	-
		3D	-	↑	↑
	OxaPt	2D	↓	↓	↓
		3D	↓	↓	↓
HES1 siRNR	K	2D	P	-	P
	5-FU	2D	↓	↓	↓
	OxaPt	2D	↓	↓	↓
ATG7 siRNR	K	2D	P	-	P
	5-FU	2D	-	-	-
	OxaPt	2D	↓	↓	↓

K, vaistu neveiktos ląstelės;

-, nėra citotoksiškas/neveikia vaisto citotoksiškumo;

T, toksiškas vaistu neveiktoms ląstelėms;

P, skatina vaistu neveiktų ląstelių proliferaciją

↑/↓, padidina/sumažina vaisto citotoksiškumą

Mūsų tyrime naudotos OxaPt dozės mažina Notch1 receptoriaus aktyvaciją tik HCT116 ir HCT116/FU, bet ne HCT116/OXA ląstelėse. Visgi Meng *et al.* tyrime mažesnė OxaPt dozė HCT116 ir SW620 ląstelių linijose veikė priešingai ir lėmė NICD1 ir HES1 baltymų kiekių padidėjimą (Meng *et al.*, 2009). Nustatėme, kad Notch signalinio kelio slopinimas RO sumažino OxaPt citotoksiškumą visoms tirtoms ląstelėms 2D ir 3D ląstelių kultūrose. Tai rodo, kad Notch signalinis kelias skatina ląstelių žūtį po OxaPt poveikio. Šiuos rezultatus paremia Timme grupės tyrimai, kuriuose tokį

efektą HCT116 ląstelėms turėjo  $\gamma$ -sekretazės slopikliai MRK003, DAPT, GSI-XII, GSI-XX. Šie autoriai parodė, kad HCT116 ląstelėse MRK003 padidina apoptozę slopinančių baltymų MCL1 ir BCLxL kiekius bei silpnina apoptozės vyksmą rodančių procesų aktyvaciją. Be to šis efektas buvo stebimas ir kitose kolorektalinės karcinomos ląstelių linijose (HT29, HCT15, SW480, Colo205) (Timme *et al.*, 2013). HES1 raiškos sumažinimas turėjo tokį patį efektą OxaPt citotoksiškumui kaip ir Notch signalinio kelio slopinimas RO. Tai rodo, kad didesnis HES1 baltymo kiekis galėtų sustiprinti OxaPt citotoksinį poveikį.

Taigi, remiantis mūsų duomenimis galima teigti, kad Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch signaliniai keliai skatina kolorektalinės karcinomos ląstelių atsparumą 5-FU, o HES1 baltymas, Notch signalinis kelias ir autofagija skatina ląstelių žūtį po OxaPt poveikio.

## IŠVADOS

- Chemoterapiniams vaistams atsparios ląstelės HCT116/FU išlieka jautrios mTHPC-FDP. mTHPC-FDP slopina autofagijos srautą;
- 5-FU mažina, o OxaPt padidina autofagijos srautą visose ląstelėse. ATG7 nutildymas nekeičia 5-FU citotoksiškumo, bet susilpnina OxaPt veikimą;
- 5-FU slopina Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch1 signalinių kelių aktyvumą visose ląstelėse, o OxaPt – tik OxaPt poveikiui jautriose ląstelėse;
- Notch signalinio kelio slopinimas didina atsparumą OxaPt visose ląstelėse;
- Chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių sferoidai yra jautresni Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch signalinių kelių slopinimui, nei HCT116 ląstelių sferoidai;
- Wnt/ $\beta$ -katenino ir Notch signalinių kelių slopinimas didina chemoterapiniams vaistams atsparių ląstelių sferoidų jautrumą 5-FU poveikiui;
- Chemoterapiniams vaistams atspariose ląstelėse padidėja HES1 raiška. 5-FU ir OxaPt mažina HES1 baltymo kiekį visose ląstelėse, o HES1 nutildymas didina atsparumą 5-FU ir OxaPt.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Acar M, Jafar-Nejad H, Takeuchi H, Rajan A, Ibrani D, Rana NA, *et al.* Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. *Cell*. 2008;132(2):247-58.
2. Aguilera O, Gonzalez-Sancho JM, Zazo S, Rincon R, Fernandez AF, Tapia O, *et al.* Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2015;6(8):5903-17.
3. Ahadi M, Andrici J, Sioson L, Sheen A, Clarkson A, Gill AJ. Loss of Hes1 expression is associated with poor prognosis in colorectal adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2016;57:91-7.
4. Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, *et al.* Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. *J Med Chem*. 2008;51(19):5932-42.
5. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, *et al.* Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2:e71.
6. Ai X, Jia Z, Liu S, Wang J, Zhang X. Notch-1 regulates proliferation and differentiation of human bladder cancer cell lines by inhibiting expression of Kruppel-like factor 4. *Oncol Rep*. 2014;32(4):1459-64.
7. Ayadi M, Bouygues A, Ouaret D, Ferrand N, Chouaib S, Thiery JP, *et al.* Chronic chemotherapeutic stress promotes evolution of stemness and WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells: implications for clinical use of WNT-signaling inhibitors. *Oncotarget*. 2015;6(21):18518-33.
8. Akpinar B, Safarikova B, Laukova J, Debnath S, Vaculova AH, Zhivotovsky B, *et al.* Aberrant DR5 transport through disruption of lysosomal function suggests a novel mechanism for receptor activation. *Oncotarget*. 2016;7(36):58286-301.
9. Alberto ME, Butera V, Russo N. Which one among the Pt-containing anticancer drugs more easily forms monoadducts with G and A DNA bases? A comparative study among oxaliplatin, nedaplatin, and carboplatin. *Inorg Chem*. 2011;50(15):6965-71.
10. Allen RD, 3rd, Kim HK, Sarafova SD, Siu G. Negative regulation of CD4 gene expression by a HES-1-c-Myb complex. *Mol Cell Biol*. 2001;21(9):3071-82.
11. Allison RR. Photodynamic therapy: oncologic horizons. *Future Oncol*. 2014;10(1):123-4.
12. Ansieau S, Strobl LJ, Leutz A. Activation of the Notch-regulated transcription factor CBF1/RBP-Jkappa through the 13SE1A oncoprotein. *Genes Dev*. 2001;15(4):380-5.
13. Antila CJM, Rraklli V, Blomster HA, Dahlstrom KM, Salminen TA, Holmberg J, *et al.* Sumoylation of Notch1 represses its target gene expression during cell stress. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):600-15.
14. Antonioli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM. Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends Biochem Sci*. 2017;42(1):28-41.
15. Arcaroli JJ, Tai WM, McWilliams R, Bagby S, Blatchford PJ, Varella-Garcia M, *et al.* A NOTCH1 gene copy number gain is a prognostic indicator of worse survival and a predictive biomarker to a Notch1 targeting antibody in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2016;138(1):195-205.
16. Azoulay-Alfaguter I, Elya R, Avrahami L, Katz A, Eldar-Finkelman H. Combined regulation of mTORC1 and lysosomal acidification by GSK-3 suppresses autophagy and contributes to cancer cell growth. *Oncogene*. 2015;34(35):4613-23.
17. Baeten JT, Lilly B. Differential Regulation of NOTCH2 and NOTCH3 Contribute to Their Unique Functions in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*. 2015;290(26):16226-37.
18. Bai X, He T, Liu Y, Zhang J, Li X, Shi J, *et al.* Acetylation-Dependent Regulation of Notch Signaling in Macrophages by SIRT1 Affects Sepsis Development. *Front Immunol*. 2018;9:762.

19. Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):19-33.
20. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature.* 2007;449(7165):1003-7.
21. Belounis A, Nyalendo C, Le Gall R, Imbriglio TV, Mahma M, Teira P, *et al.* Autophagy is associated with chemoresistance in neuroblastoma. *BMC Cancer.* 2016;16(1):891.
22. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, *et al.* Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem.* 2016;85:685-713.
23. Bhat P, Kriel J, Shubha Priya B, Basappa, Shivananju NS, Loos B. Modulating autophagy in cancer therapy: Advancements and challenges for cancer cell death sensitization. *Biochem Pharmacol.* 2018;147:170-82.
24. Bhattacharya S, Das A, Mallya K, Ahmad I. Maintenance of retinal stem cells by *Abcg2* is regulated by notch signaling. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 15):2652-62.
25. Bijnsdorp IV, Peters GJ, Temmink OH, Fukushima M, Kruyt FA. Differential activation of cell death and autophagy results in an increased cytotoxic potential for trifluorothymidine compared to 5-fluorouracil in colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2010;126(10):2457-68.
26. Blache P, van de Wetering M, Duluc I, Domon C, Berta P, Freund JN, *et al.* SOX9 is an intestine crypt transcription factor, is regulated by the Wnt pathway, and represses the CDX2 and MUC2 genes. *J Cell Biol.* 2004;166(1):37-47.
27. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell.* 1997;90(2):281-91.
28. Bodine PV, Stauffer B, Ponce-de-Leon H, Bhat RA, Mangine A, Seestaller-Wehr LM, *et al.* A small molecule inhibitor of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 stimulates bone formation. *Bone.* 2009;44(6):1063-8.
29. Boelens MC, Wu TJ, Nabet BY, Xu B, Qiu Y, Yoon T, *et al.* Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell.* 2014;159(3):499-513.
30. Borggrefe T, Lauth M, Zwijsen A, Huylebroeck D, Oswald F, Giaimo BD. The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGFbeta/BMP and hypoxia pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(2):303-13.
31. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(11):722-35.
32. Bray SJ, Gomez-Lamarca M. Notch after cleavage. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;51:103-9.
33. Bruno PM, Liu Y, Park GY, Murai J, Koch CE, Eisen TJ, *et al.* A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress. *Nat Med.* 2017;23(4):461-71.
34. Burada F, Nicoli ER, Ciurea ME, Uscatu DC, Ioana M, Gheonea DI. Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. *World J Gastrointest Oncol.* 2015;7(11):271-84.
35. Burger H, Zoumaro-Djayoon A, Boersma AW, Helleman J, Berns EM, Mathijssen RH, *et al.* Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *Br J Pharmacol.* 2010;159(4):898-908.
36. Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3604-13.
37. Cao F, Li J, Sun H, Liu S, Cui Y, Li F. HES 1 is essential for chemoresistance induced by stellate cells and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Oncol Rep.* 2015;33(4):1883-9.

38. Capodanno Y, Buishand FO, Pang LY, Kirpensteijn J, Mol JA, Argyle DJ. Notch pathway inhibition targets chemoresistant insulinoma cancer stem cells. *Endocr Relat Cancer*. 2018;25(2):131-44.
39. Ceckova M, Vackova Z, Radilova H, Libra A, Buncek M, Staud F. Effect of ABCG2 on cytotoxicity of platinum drugs: interference of EGFP. *Toxicol In Vitro*. 2008;22(8):1846-52.
40. Celli JP, Solban N, Liang A, Pereira SP, Hasan T. Verteporfin-based photodynamic therapy overcomes gemcitabine insensitivity in a panel of pancreatic cancer cell lines. *Lasers Surg Med*. 2011;43(7):565-74.
41. Chalaris A, Gewiese J, Paliga K, Fleig L, Schneede A, Krieger K, *et al*. ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(2):234-45.
42. Chandra V, Bhagyaraj E, Parkesh R, Gupta P. Transcription factors and cognate signalling cascades in the regulation of autophagy. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2016;91(2):429-51.
43. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;53(1):3-11.
44. Chen Y, Li D, Liu H, Xu H, Zheng H, Qian F, *et al*. Notch-1 signaling facilitates survivin expression in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biol Ther*. 2011;11(1):14-21.
45. Chen JY, Mak NK, Yow CM, Fung MC, Chiu LC, Leung WN, *et al*. The binding characteristics and intracellular localization of temoporfin (mTHPC) in myeloid leukemia cells: phototoxicity and mitochondrial damage. *Photochem Photobiol*. 2000;72(4):541-7.
46. Chen W, Wong C, Vosburgh E, Levine AJ, Foran DJ, Xu EY. High-throughput image analysis of tumor spheroids: a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J Vis Exp*. 2014(89).
47. Cho S, Lu M, He X, Ee PL, Bhat U, Schneider E, *et al*. Notch1 regulates the expression of the multidrug resistance gene ABCC1/MRP1 in cultured cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(51):20778-83.
48. Choy L, Hagenbeek TJ, Solon M, French D, Finkle D, Shelton A, *et al*. Constitutive NOTCH3 Signaling Promotes the Growth of Basal Breast Cancers. *Cancer Res*. 2017;77(6):1439-52.
49. Christie C, Pomeroy A, Nair R, Berg K, Hirschberg H. Photodynamic therapy enhances the efficacy of gene-directed enzyme prodrug therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;18:140-8.
50. Chu D, Zheng J, Wang W, Zhao Q, Li Y, Li J, *et al*. Notch2 expression is decreased in colorectal cancer and related to tumor differentiation status. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(12):3259-66.
51. Chu D, Zhou Y, Zhang Z, Li Y, Li J, Zheng J, *et al*. Notch1 expression, which is related to p65 Status, is an independent predictor of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(17):5686-94.
52. Cianfanelli V, Fuoco C, Lorente M, Salazar M, Quondamatteo F, Gherardini PF, *et al*. AMBRA1 links autophagy to cell proliferation and tumorigenesis by promoting c-Myc dephosphorylation and degradation. *Nat Cell Biol*. 2015;17(1):20-30.
53. Coghlan MP, Culbert AA, Cross DA, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, *et al*. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol*. 2000;7(10):793-803.
54. Cohen B, Shimizu M, Izrailit J, Ng NF, Buchman Y, Pan JG, *et al*. Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010a;123(1):113-24.
55. Cohen M, Georgiou M, Stevenson NL, Miodownik M, Baum B. Dynamic filopodia transmit intermittent Delta-Notch signaling to drive pattern refinement during lateral inhibition. *Dev Cell*. 2010b;19(1):78-89.



56. Colaluca IN, Tosoni D, Nuciforo P, Senic-Matuglia F, Galimberti V, Viale G, *et al.* NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature*. 2008;451(7174):76-80.
57. Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev*. 2008;22(6):746-55.
58. Collesi C, Felician G, Secco I, Gutierrez MI, Martelletti E, Ali H, *et al.* Reversible Notch1 acetylation tunes proliferative signalling in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2018;114(1):103-22.
59. Colliton RP, Bason L, Lu FM, Piccoli DA, Krantz ID, Spinner NB. Mutation analysis of Jagged1 (JAG1) in Alagille syndrome patients. *Hum Mutat*. 2001;17(2):151-2.
60. Collu GM, Hidalgo-Sastre A, Brennan K. Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(18):3553-67.
61. Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A. Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev*. 2002;16(16):2058-72.
62. Correa S, Binato R, Du Rocher B, Castelo-Branco MT, Pizzatti L, Abdelhay E. Wnt/beta-catenin pathway regulates ABCB1 transcription in chronic myeloid leukemia. *BMC Cancer*. 2012;12:303.
63. Cuyle PJ, Prenen H. Current and future biomarkers in the treatment of colorectal cancer. *Acta Clin Belg*. 2017;72(2):103-15.
64. D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G. The many facets of Notch ligands. *Oncogene*. 2008;27(38):5148-67.
65. Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G, 2nd, *et al.* Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res*. 2009;69(5):1951-7.
66. Das D, Preet R, Mohapatra P, Satapathy SR, Siddharth S, Tamir T, *et al.* 5-Fluorouracil mediated anti-cancer activity in colon cancer cells is through the induction of Adenomatous Polyposis Coli: Implication of the long-patch base excision repair pathway. *DNA Repair (Amst)*. 2014;24:15-25.
67. De A. Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011;43(10):745-56.
68. de Celis JF, Bray SJ. The Abruptex domain of Notch regulates negative interactions between Notch, its ligands and Fringe. *Development*. 2000;127(6):1291-302.
69. Deitrick J, Pruitt WM. Wnt/beta Catenin-Mediated Signaling Commonly Altered in Colorectal Cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;144:49-68.
70. Deng C, Reddy P, Cheng Y, Luo CW, Hsiao CL, Hsueh AJ. Multi-functional norrin is a ligand for the LGR4 receptor. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 9):2060-8.
71. Dianov GL. Base excision repair targets for cancer therapy. *Am J Cancer Res*. 2011;1(7):845-51.
72. Diefenbacher ME, Chakraborty A, Blake SM, Mitter R, Popov N, Eilers M, *et al.* Usp28 counteracts Fbw7 in intestinal homeostasis and cancer. *Cancer Res*. 2015;75(7):1181-6.
73. Diefenbacher ME, Popov N, Blake SM, Schulein-Volk C, Nye E, Spencer-Dene B, *et al.* The deubiquitinase USP28 controls intestinal homeostasis and promotes colorectal cancer. *J Clin Invest*. 2014;124(8):3407-18.
74. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):349-64.
75. Dinicola S, Pasqualato A, Proietti S, Masiello MG, Palombo A, Coluccia P, *et al.* Paradoxical E-cadherin increase in 5FU-resistant colon cancer is unaffected during mesenchymal-epithelial reversion induced by gamma-secretase inhibition. *Life Sci*. 2016;145:174-83.

76. Doles J, Oliver TG, Cameron ER, Hsu G, Jacks T, Walker GC, *et al.* Suppression of Rev3, the catalytic subunit of Pol{zeta}, sensitizes drug-resistant lung tumors to chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(48):20786-91.
77. Dong HJ, Jang GB, Lee HY, Park SR, Kim JY, Nam JS, *et al.* The Wnt/beta-catenin signaling/Id2 cascade mediates the effects of hypoxia on the hierarchy of colorectal-cancer stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:22966.
78. Duggan SP, McCarthy JV. Beyond gamma-secretase activity: The multifunctional nature of presenilins in cell signalling pathways. *Cell Signal.* 2016;28(1):1-11.
79. El Fiky A, Arch AE, Krolewski JJ. Intracellular domain of the IFN $\alpha$ 2 interferon receptor subunit mediates transcription via Stat2. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):567-73.
80. Eliopoulos AG, Havaki S, Gorgoulis VG. DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. *Front Genet.* 2016;7:204.
81. Elzinga BM, Twomey C, Powell JC, Harte F, McCarthy JV. Interleukin-1 receptor type 1 is a substrate for gamma-secretase-dependent regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem.* 2009;284(3):1394-409.
82. Espinosa L, Ingles-Esteve J, Aguilera C, Bigas A. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways. *J Biol Chem.* 2003;278(34):32227-35.
83. Esposito D, Crescenzi E, Sagar V, Loreni F, Russo A, Russo G. Human rpl3 plays a crucial role in cell response to nucleolar stress induced by 5-FU and L-OHP. *Oncotarget.* 2014;5(22):11737-51.
84. Feng Z, Hu W, de Stanchina E, Teresky AK, Jin S, Lowe S, *et al.* The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 2007;67(7):3043-53.
85. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
86. Fernandez-Martinez J, Vela EM, Tora-Ponsioen M, Ocana OH, Nieto MA, Galceran J. Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 10):1574-83.
87. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J Biol Chem.* 2002;277(36):33398-410.
88. Fodale V, Pierobon M, Liotta L, Petricoin E. Mechanism of cell adaptation: when and how do cancer cells develop chemoresistance? *Cancer J.* 2011;17(2):89-95.
89. Frejno M, Zenezini Chiozzi R, Wilhelm M, Koch H, Zheng R, Klaeger S, *et al.* Pharmacoproteomic characterisation of human colon and rectal cancer. *Mol Syst Biol.* 2017;13(11):951.
90. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc.* 2009;4(3):309-24.
91. Fujimori K, Kadoyama K, Urade Y. Protein kinase C activates human lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression through de-repression of notch-HES signaling and enhancement of AP-2 beta function in brain-derived TE671 cells. *J Biol Chem.* 2005;280(18):18452-61.
92. Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, Sone K, Inaba K, Ikeda Y, *et al.* The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition. *Gynecol Oncol.* 2015;137(3):538-45.
93. Fullgrabe J, Ghislat G, Cho DH, Rubinsztein DC. Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance. *J Cell Sci.* 2016;129(16):3059-66.
94. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* 2017a;36(13):1811-36.

95. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, Green DR, Kroemer G. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov.* 2017b;16(7):487-511.
96. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015;34(7):856-80.
97. Gammons M, Bienz M. Multiprotein complexes governing Wnt signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2018;51:42-9.
98. Gao C, Cao W, Bao L, Zuo W, Xie G, Cai T, *et al.* Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation. *Nat Cell Biol.* 2010;12(8):781-90.
99. Gao F, Huang W, Zhang Y, Tang S, Zheng L, Ma F, *et al.* Hes1 promotes cell proliferation and migration by activating Bmi-1 and PTEN/Akt/GSK3beta pathway in human colon cancer. *Oncotarget.* 2015;6(36):38667-80.
100. Gao F, Zhang Y, Wang S, Liu Y, Zheng L, Yang J, *et al.* Hes1 is involved in the self-renewal and tumourigenicity of stem-like cancer cells in colon cancer. *Sci Rep.* 2014;4:3963.
101. Gao Y, Liu Z, Zhang X, He J, Pan Y, Hao F, *et al.* Inhibition of cytoplasmic GSK-3beta increases cisplatin resistance through activation of Wnt/beta-catenin signaling in A549/DDP cells. *Cancer Lett.* 2013;336(1):231-9.
102. Gao J, Liu J, Fan D, Xu H, Xiong Y, Wang Y, *et al.* Up-regulated expression of Notch1 and Jagged1 in human colon adenocarcinoma. *Pathol Biol (Paris).* 2011;59(6):298-302.
103. Garcia-Heredia JM, Carnero A. NUMB and NUMBL differences in gene regulation. *Oncotarget.* 2018;9(10):9219-34.
104. Garcia-Heredia JM, Verdugo Sivianes EM, Lucena-Cacace A, Molina-Pinelo S, Carnero A. Numb-like (NumbL) downregulation increases tumorigenicity, cancer stem cell-like properties and resistance to chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(39):63611-28.
105. Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, *et al.* L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol.* 2005;168(4):633-42.
106. Goler-Baron V, Assaraf YG. Overcoming multidrug resistance via photodestruction of ABCG2-rich extracellular vesicles sequestering photosensitive chemotherapeutics. *PLoS One.* 2012;7(4):e35487.
107. Gomez-Orte E, Saenz-Narciso B, Moreno S, Cabello J. Multiple functions of the noncanonical Wnt pathway. *Trends Genet.* 2013;29(9):545-53.
108. Gong L, Hirschfeld D, Tan YC, Heather Hogg J, Peltz G, Avnur Z, *et al.* Discovery of potent and bioavailable GSK-3beta inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(5):1693-6.
109. Goschl S, Schreiber-Brynzak E, Pichler V, Cseh K, Heffeter P, Jungwirth U, *et al.* Comparative studies of oxaliplatin-based platinum(IV) complexes in different in vitro and in vivo tumor models. *Metallomics.* 2017;9(3):309-22.
110. Gowrishankar K, Zeidler MG, Vincenz C. Release of a membrane-bound death domain by gamma-secretase processing of the p75NTR homolog NRADD. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 18):4099-111.
111. Grassilli E, Narloch R, Federzoni E, Ianzano L, Pisano F, Giovannoni R, *et al.* Inhibition of GSK3B bypass drug resistance of p53-null colon carcinomas by enabling necroptosis in response to chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3820-31.
112. Grem JL, Fischer PH. Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyrindamole. *Pharmacol Ther.* 1989;40(3):349-71.
113. Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H. Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1. *Int J Cancer.* 2000;88(3):401-10.
114. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol.* 2012;14(10):1036-45.

115. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, *et al.* Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 2010;24(22):2517-30.
116. Guarani V, Deflorian G, Franco CA, Kruger M, Phng LK, Bentley K, *et al.* Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase. *Nature.* 2011;473(7346):234-8.
117. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, *et al.* The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.
118. Guiu J, Bergen DJ, De Pater E, Islam AB, Ayllon V, Gama-Norton L, *et al.* Identification of *Cdca7* as a novel Notch transcriptional target involved in hematopoietic stem cell emergence. *J Exp Med.* 2014;211(12):2411-23.
119. Gulen MF, Bulek K, Xiao H, Yu M, Gao J, Sun L, *et al.* Inactivation of the enzyme GSK3 $\alpha$  by the kinase IKKi promotes AKT-mTOR signaling pathway that mediates interleukin-1-induced Th17 cell maintenance. *Immunity.* 2012;37(5):800-12.
120. Guo D, Ye J, Dai J, Li L, Chen F, Ma D, *et al.* Notch-1 regulates Akt signaling pathway and the expression of cell cycle regulatory proteins cyclin D1, CDK2 and p21 in T-ALL cell lines. *Leuk Res.* 2009a;33(5):678-85.
121. Guo Q, Chen Y, Zhang B, Kang M, Xie Q, Wu Y. Potentiation of the effect of gemcitabine by emodin in pancreatic cancer is associated with survivin inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2009b;77(11):1674-83.
122. Gupta-Rossi N, Ortica S, Meas-Yedid V, Heuss S, Moretti J, Olivo-Marin JC, *et al.* The adaptor-associated kinase 1, AAK1, is a positive regulator of the Notch pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(21):18720-30.
123. Gupta-Rossi N, Six E, LeBail O, Logeat F, Chastagner P, Olry A, *et al.* Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor. *J Cell Biol.* 2004;166(1):73-83.
124. Gupta N, Xu Z, El-Sehemy A, Steed H, Fu Y. Notch3 induces epithelial-mesenchymal transition and attenuates carboplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol.* 2013;130(1):200-6.
125. Gwak J, Hwang SG, Park HS, Choi SR, Park SH, Kim H, *et al.* Small molecule-based disruption of the Axin/beta-catenin protein complex regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Res.* 2012;22(1):237-47.
126. Hagmann W, Jesnowski R, Faissner R, Guo C, Lohr JM. ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatol.* 2009;9(1-2):136-44.
127. Haikarainen T, Venkannagari H, Narwal M, Obaji E, Lee HW, Nkizinkiko Y, *et al.* Structural basis and selectivity of tankyrase inhibition by a Wnt signaling inhibitor WIKI4. *PLoS One.* 2013;8(6):e65404.
128. Haller R, Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K, Kramer J, Just U, *et al.* Notch1 signaling regulates chondrogenic lineage determination through Sox9 activation. *Cell Death Differ.* 2012;19(3):461-9.
129. Han X, Ju JH, Shin I. Glycogen synthase kinase 3-beta phosphorylates novel S/T-P-S/T domains in Notch1 intracellular domain and induces its nuclear localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(2):282-8.
130. Han X, Ranganathan P, Tzimas C, Weaver KL, Jin K, Astudillo L, *et al.* Notch Represses Transcription by PRC2 Recruitment to the Ternary Complex. *Mol Cancer Res.* 2017;15(9):1173-83.
131. Hartman J, Muller P, Foster JS, Wimalasena J, Gustafsson JA, Strom A. HES-1 inhibits 17 $\beta$ -estradiol and heregulin-beta1-mediated upregulation of E2F-1. *Oncogene.* 2004;23(54):8826-33.
132. Hassan WA, Yoshida R, Kudoh S, Kameyama H, Hasegawa K, Niimori-Kita K, *et al.* Notch1 controls cell chemoresistance in small cell lung carcinoma cells. *Thorac Cancer.* 2016;7(1):123-8.

133. He F, Du T, Jiang Q, Zhang Y. Synergistic Effect of Notch-3-Specific Inhibition and Paclitaxel in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells Via Activation of The Intrinsic Apoptosis Pathway. *Med Sci Monit*. 2017;23:3760-9.
134. He L, Zhu H, Zhou S, Wu T, Wu H, Yang H, *et al*. Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Exp Mol Med*. 2018;50(8):101.
135. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. 1999;99(3):335-45.
136. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, *et al*. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281(5382):1509-12.
137. He W, Chan CM, Wong SC, Au TC, Ho WS, Chan AK, *et al*. Jagged 2 silencing inhibits motility and invasiveness of colorectal cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2016;12(6):5193-8.
138. Hein K, Mittler G, Cizelsky W, Kuhl M, Ferrante F, Liefke R, *et al*. Site-specific methylation of Notch1 controls the amplitude and duration of the Notch1 response. *Sci Signal*. 2015;8(369):ra30.
139. Hemming ML, Elias JE, Gygi SP, Selkoe DJ. Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol*. 2008;6(10):e257.
140. Henry CE, Llamas E, Djordjevic A, Hacker NF, Ford CE. Migration and invasion is inhibited by silencing ROR1 and ROR2 in chemoresistant ovarian cancer. *Oncogenesis*. 2016;5(5):e226.
141. Herr P, Hausmann G, Basler K. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends Mol Med*. 2012;18(8):483-93.
142. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):714-26.
143. Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol*. 2010;77(6):887-94.
144. Huang J, Chen Y, Li J, Zhang K, Chen J, Chen D, *et al*. Notch-1 Confers Chemoresistance in Lung Adenocarcinoma to Taxanes through AP-1/microRNA-451 Mediated Regulation of MDR-1. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016a;5(10):e375.
145. Huang J, Zhang Y, Bersenev A, O'Brien WT, Tong W, Emerson SG, *et al*. Pivotal role for glycogen synthase kinase-3 in hematopoietic stem cell homeostasis in mice. *J Clin Invest*. 2009a;119(12):3519-29.
146. Huang L, Jin Y, Feng S, Zou Y, Xu S, Qiu S, *et al*. Role of Wnt/beta-catenin, Wnt/c-Jun N-terminal kinase and Wnt/Ca(2+) pathways in cisplatin-induced chemoresistance in ovarian cancer. *Exp Ther Med*. 2016b;12(6):3851-8.
147. Huang R, Wang G, Song Y, Tang Q, You Q, Liu Z, *et al*. Colorectal cancer stem cell and chemoresistant colorectal cancer cell phenotypes and increased sensitivity to Notch pathway inhibitor. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2417-24.
148. Huang SM, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, *et al*. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009b;461(7264):614-20.
149. Huenniger K, Kramer A, Soom M, Chang I, Kohler M, Depping R, *et al*. Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(18):3187-96.
150. Humphries AC, Mlodzik M. From instruction to output: Wnt/PCP signaling in development and cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2018;51:110-6.
151. Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, *et al*. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol Cell Biol*. 2001;21(12):3888-900.
152. Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, *et al*. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 2006;126(5):955-68.

153. Ishiguro H, Okubo T, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Sugito N, *et al.* NOTCH1 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway in colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(36):60378-89.
154. Ishitani T, Hirao T, Suzuki M, Isoda M, Ishitani S, Harigaya K, *et al.* Nemo-like kinase suppresses Notch signalling by interfering with formation of the Notch active transcriptional complex. *Nat Cell Biol*. 2010;12(3):278-85.
155. Iso T, Chung G, Hamamori Y, Keddes L. HERP1 is a cell type-specific primary target of Notch. *J Biol Chem*. 2002;277(8):6598-607.
156. Izon DJ, Aster JC, He Y, Weng A, Karnell FG, Patriub V, *et al.* Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity*. 2002;16(2):231-43.
157. Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, Hiraoka-Kanie M, *et al.* Convergence of Notch and beta-catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. *J Cell Biol*. 2010;189(2):325-38.
158. Yang C, Zhou Q, Li M, Tong X, Sun J, Qing Y, *et al.* Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines. *Sci Rep*. 2016a;6:33078.
159. Yang HZ, Ma Y, Zhou Y, Xu LM, Chen XJ, Ding WB, *et al.* Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. *Cancer Lett*. 2015;361(1):128-36.
160. Yang Y, Yang JJ, Tao H, Jin WS. New perspectives on beta-catenin control of cell fate and proliferation in colon cancer. *Food Chem Toxicol*. 2014a;74:14-9.
161. Yang Y, Li H, Hou S, Hu B, Liu J, Wang J. The noncoding RNA expression profile and the effect of lncRNA AK126698 on cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer cell. *PLoS One*. 2013;8(5):e65309.
162. Yang Y, Ma B, Jin Y, Ben W, Zhang D, Jiang K, *et al.* Bioinformatic mining of kinase inhibitors that regulate autophagy through kinase signaling pathways. *Mol Med Rep*. 2014b;10(6):3348-56.
163. Yang SW, Ping YF, Jiang YX, Luo X, Zhang X, Bian XW, *et al.* ATG4A promotes tumor metastasis by inducing the epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties in gastric cells. *Oncotarget*. 2016b;7(26):39279-92.
164. Yao CW, Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Fernando P, Oh MC, *et al.* Reduced Autophagy in 5-Fluorouracil Resistant Colon Cancer Cells. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017;25(3):315-20.
165. Yao J, Zheng K, Li C, Liu H, Shan X. Interference of Notch1 inhibits the growth of glioma cancer cells by inducing cell autophagy and down-regulation of Notch1-Hes-1 signaling pathway. *Med Oncol*. 2015;32(6):610.
166. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microb Cell*. 2016;3(12):588-96.
167. Yokoo S, Masuda S, Yonezawa A, Terada T, Katsura T, Inui K. Significance of organic cation transporter 3 (SLC22A3) expression for the cytotoxic effect of oxaliplatin in colorectal cancer. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(11):2299-306.
168. Yu CH, Yu CC. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid (ALA) impairs tumor initiating and chemo-resistance property in head and neck cancer-derived cancer stem cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e87129.
169. Yu JB, Jiang H, Zhan RY. Aberrant Notch signaling in glioblastoma stem cells contributes to tumor recurrence and invasion. *Mol Med Rep*. 2016a;14(2):1263-8.
170. Yu XM, Jaskula-Sztul R, Georgen MR, Aburjania Z, Somnay YR, Levenson G, *et al.* Notch1 Signaling Regulates the Aggressiveness of Differentiated Thyroid Cancer and Inhibits SERPINE1 Expression. *Clin Cancer Res*. 2016b;22(14):3582-92.
171. Yuan D, Liu L, Gu D. Transcriptional regulation of livin by beta-catenin/TCF signaling in human lung cancer cell lines. *Mol Cell Biochem*. 2007;306(1-2):171-8.

172. Yuan J, Lv H, Peng B, Wang C, Yu Y, He Z. Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009;63(6):1103-10.
173. Yuan R, Ke J, Sun L, He Z, Zou Y, He X, *et al.* HES1 promotes metastasis and predicts poor survival in patients with colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2015a;32(2):169-79.
174. Yuan X, Wu H, Xu H, Xiong H, Chu Q, Yu S, *et al.* Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. *Cancer Lett.* 2015b;369(1):20-7.
175. James AC, Szot JO, Iyer K, Major JA, Pursglove SE, Chapman G, *et al.* Notch4 reveals a novel mechanism regulating Notch signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(7):1272-84.
176. Janda CY, Waghay D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science.* 2012;337(6090):59-64.
177. Jaskula-Sztul R, Eide J, Tesfazghi S, Dammalapati A, Harrison AD, Yu XM, *et al.* Tumor-suppressor role of Notch3 in medullary thyroid carcinoma revealed by genetic and pharmacological induction. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(2):499-512.
178. Jensen NF, Smith DH, Nygard SB, Romer MU, Nielsen KV, Brunner N. Predictive biomarkers with potential of converting conventional chemotherapy to targeted therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47(3):340-55.
179. Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantini F. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2002;22(4):1172-83.
180. Jia Z, Wang J, Wang W, Tian Y, XiangWei W, Chen P, *et al.* Autophagy eliminates cytoplasmic beta-catenin and NICD to promote the cardiac differentiation of P19CL6 cells. *Cell Signal.* 2014;26(11):2299-305.
181. Junge HJ, Yang S, Burton JB, Paes K, Shu X, French DM, *et al.* TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling. *Cell.* 2009;139(2):299-311.
182. Jurisch-Yaksi N, Sannerud R, Annaert W. A fast growing spectrum of biological functions of gamma-secretase in development and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(12):2815-27.
183. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19(21):5720-8.
184. Kakugawa S, Langton PF, Zebisch M, Howell S, Chang TH, Liu Y, *et al.* Notum deacylates Wnt proteins to suppress signalling activity. *Nature.* 2015;519(7542):187-92.
185. Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y. Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol.* 2004;6(6):547-54.
186. Kangsamaksin T, Murtomaki A, Kofler NM, Cuervo H, Chaudhri RA, Tattersall IW, *et al.* NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth. *Cancer Discov.* 2015;5(2):182-97.
187. Karyo R, Eskira Y, Pinhasov A, Belmaker R, Agam G, Eldar-Finkelman H. Identification of eukaryotic elongation factor-2 as a novel cellular target of lithium and glycogen synthase kinase-3. *Mol Cell Neurosci.* 2010;45(4):449-55.
188. Katoh Y, Katoh M. Comparative genomics on Wnt11 gene. *Int J Mol Med.* 2005a;15(5):879-83.
189. Katoh M, Katoh M. Comparative genomics on Wnt5a and Wnt5b genes. *Int J Mol Med.* 2005b;15(4):749-53.
190. Kawazoe K, Isomoto H, Yamaguchi N, Inoue N, Uehara R, Matsushima K, *et al.* Effects of photodynamic therapy for superficial esophageal squamous cell carcinoma in vivo and in vitro. *Oncol Lett.* 2010;1(5):877-82.

191. Kawczyk-Krupka A, Bugaj AM, Latos W, Zaremba K, Wawrzyniec K, Kucharzewski M, *et al.* Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment--The state of the art in preclinical research. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016;13:158-74.
192. Kawczyk-Krupka A, Bugaj AM, Latos W, Zaremba K, Wawrzyniec K, Sieron A. Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: the state of the art in clinical trials. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(3):545-53.
193. Kessel D. Autophagic death probed by photodynamic therapy. *Autophagy.* 2015;11(10):1941-3.
194. Kessel D, Evans CL. Promotion of Proapoptotic Signals by Lysosomal Photodamage: Mechanistic Aspects and Influence of Autophagy. *Photochem Photobiol.* 2016;92(4):620-3.
195. Kessel DH, Price M, Reiners JJ, Jr. ATG7 deficiency suppresses apoptosis and cell death induced by lysosomal photodamage. *Autophagy.* 2012;8(9):1333-41.
196. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* 2016;26(1):6-16.
197. Kibria G, Hatakeyama H, Harashima H. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system. *Arch Pharm Res.* 2014;37(1):4-15.
198. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 2009;19(3):119-29.
199. Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2011;291:21-71.
200. Kim B, Stephen SL, Hanby AM, Horgan K, Pery SL, Richardson J, *et al.* Chemotherapy induces Notch1-dependent MRP1 up-regulation, inhibition of which sensitizes breast cancer cells to chemotherapy. *BMC Cancer.* 2015;15:634.
201. Kim JS, Crooks H, Foxworth A, Waldman T. Proof-of-principle: oncogenic beta-catenin is a valid molecular target for the development of pharmacological inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2002;1(14):1355-9.
202. Kim MY, Ann EJ, Kim JY, Mo JS, Park JH, Kim SY, *et al.* Tip60 histone acetyltransferase acts as a negative regulator of Notch1 signaling by means of acetylation. *Mol Cell Biol.* 2007;27(18):6506-19.
203. Kobayashi Y, Ohshiro N, Sakai R, Ohbayashi M, Kohyama N, Yamamoto T. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J Pharm Pharmacol.* 2005;57(5):573-8.
204. 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(12):1776-84.
205. Koch S. Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. *Differentiation.* 2017;97:1-8.
206. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4(2):68-75.
207. Koo BK, Yoon MJ, Yoon KJ, Im SK, Kim YY, Kim CH, *et al.* An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development. *PLoS One.* 2007;2(11):e1221.
208. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* 2009;137(2):216-33.
209. Koutelou E, Sato S, Tomomori-Sato C, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, *et al.* Neuralized-like 1 (Neurl1) targeted to the plasma membrane by N-myristoylation regulates the Notch ligand Jagged1. *J Biol Chem.* 2008;283(7):3846-53.
210. Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D, Kopan R. The Canonical Notch Signaling Pathway: Structural and Biochemical Insights into Shape, Sugar, and Force. *Dev Cell.* 2017;41(3):228-41.
211. Krausova M, Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal.* 2014;26(3):570-9.



212. Kretzschmar K, Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in adult mammalian epithelial stem cells. *Dev Biol.* 2017;428(2):273-82.
213. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:50-60.
214. Kruppa AJ, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic.* 2016;17(8):878-90.
215. Kudinov AE, Karanicolas J, Golemis EA, Bumber Y. Musashi RNA-Binding Proteins as Cancer Drivers and Novel Therapeutic Targets. *Clin Cancer Res.* 2017;23(9):2143-53.
216. Kugimiya N, Nishimoto A, Hosoyama T, Ueno K, Enoki T, Li TS, *et al.* The c-MYC-ABC5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19(7):1569-81.
217. Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem.* 2000;275(17):12701-11.
218. Kuhn PH, Marjaux E, Imhof A, De Strooper B, Haass C, Lichtenthaler SF. Regulated intramembrane proteolysis of the interleukin-1 receptor II by alpha-, beta-, and gamma-secretase. *J Biol Chem.* 2007;282(16):11982-95.
219. Kulbacka J, Chwilkowska A, Bar J, Pola A, Banas T, Gamian A, *et al.* Oxidative alterations induced in vitro by the photodynamic reaction in doxorubicin-sensitive (LoVo) and -resistant (LoVoDX) colon adenocarcinoma cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(1):98-110.
220. Kumar R, Juillerat-Jeanneret L, Golshayan D. Notch Antagonists: Potential Modulators of Cancer and Inflammatory Diseases. *J Med Chem.* 2016;59(17):7719-37.
221. La Rovere RM, Roest G, Bultynck G, Parys JB. Intracellular Ca(2+) signaling and Ca(2+) microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy. *Cell Calcium.* 2016;60(2):74-87.
222. Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, *et al.* The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands. *J Cell Biol.* 2005;170(6):983-92.
223. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacol Ther.* 2000;85(3):217-29.
224. LaVoie MJ, Selkoe DJ. The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments. *J Biol Chem.* 2003;278(36):34427-37.
225. Lee B, Lee TH, Shim J. Emerin suppresses Notch signaling by restricting the Notch intracellular domain to the nuclear membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1864(2):303-13.
226. Lee JS, Thomas DM, Gutierrez G, Carty SA, Yanagawa S, Hinds PW. HES1 cooperates with pRb to activate RUNX2-dependent transcription. *J Bone Miner Res.* 2006;21(6):921-33.
227. Leung WN, Sun X, Mak NK, Yow CM. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol.* 2002;75(4):406-11.
228. Li C, Guo D, Tang B, Zhang Y, Zhang K, Nie L. Notch1 is associated with the multidrug resistance of hypoxic osteosarcoma by regulating MRP1 gene expression. *Neoplasma.* 2016;63(5):734-42.
229. Li L, Tang P, Li S, Qin X, Yang H, Wu C, *et al.* Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Med Oncol.* 2017;34(10):180.
230. Li T, Li YM, Ahn K, Price DL, Sisodia SS, Wong PC. Increased expression of PS1 is sufficient to elevate the level and activity of gamma-secretase in vivo. *PLoS One.* 2011;6(11):e28179.

231. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(7):1125-36.
232. Liang Y, Chang J, Lynch SJ, Lukac DM, Ganem D. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signaling pathway. *Genes Dev.* 2002;16(15):1977-89.
233. Lietuvos vėžio registras [Website]. Vilnius: Nacionalinis vėžio institutas; 2012 [atnaujinta 2018 03 27; cituota 2018 03 30]. Adresas: <http://www.nvi.lt/vezio-registras>.
234. Linnekamp JF, Hooff SRV, Prasetyanti PR, Kandimalla R, Buikhuizen JY, Fessler E, *et al.* Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):616-33.
235. Lippai M, Szatmari Z. Autophagy-from molecular mechanisms to clinical relevance. *Cell Biol Toxicol.* 2017;33(2):145-68.
236. Liu H, Yin Y, Hu Y, Feng Y, Bian Z, Yao S, *et al.* miR-139-5p sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by targeting NOTCH-1. *Pathol Res Pract.* 2016;212(7):643-9.
237. Liu H, Zhou P, Lan H, Chen J, Zhang YX. Comparative analysis of Notch1 and Notch2 binding sites in the genome of BxPC3 pancreatic cancer cells. *J Cancer.* 2017;8(1):65-73.
238. Liu J, Wu X, Mitchell B, Kintner C, Ding S, Schultz PG. A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005;44(13):1987-90.
239. Liu W. SEPT4 is regulated by the Notch signaling pathway. *Mol Biol Rep.* 2012;39(4):4401-9.
240. Liu W, Baer MR, Bowman MJ, Pera P, Zheng X, Morgan J, *et al.* The tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate enhances the efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2. *Clin Cancer Res.* 2007;13(8):2463-70.
241. Liu W, Zhang Z, Zhang Y, Chen X, Guo S, Lei Y, *et al.* HMGB1-mediated autophagy modulates sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin via MEK/ERK signaling pathway. *Cancer Biol Ther.* 2015a;16(4):511-7.
242. Liu ZH, Dai XM, Du B. Hes1: a key role in stemness, metastasis and multidrug resistance. *Cancer Biol Ther.* 2015b;16(3):353-9.
243. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(5):330-8.
244. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005;205(2):275-92.
245. Ma Y, Li M, Si J, Xiong Y, Lu F, Zhang J, *et al.* Blockade of Notch3 inhibits the stem-like property and is associated with ALDH1A1 and CD44 via autophagy in non-small lung cancer. *Int J Oncol.* 2016;48(6):2349-58.
246. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9-26.
247. Maddodi N, Bhat KM, Devi S, Zhang SC, Setaluri V. Oncogenic BRAFV600E induces expression of neuronal differentiation marker MAP2 in melanoma cells by promoter demethylation and down-regulation of transcription repressor HES1. *J Biol Chem.* 2010;285(1):242-54.
248. Mah IK, Soloff R, Hedrick SM, Mariani FV. Atypical PKC-iota Controls Stem Cell Expansion via Regulation of the Notch Pathway. *Stem Cell Reports.* 2015;5(5):866-80.
249. Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, *et al.* Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(4):1603-8.
250. Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(8):1167-76.
251. Marchal S, Francois A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L. Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer.* 2007;96(6):944-51.

252. Marinkovic M, Sprung M, Buljubasic M, Novak I. Autophagy Modulation in Cancer: Current Knowledge on Action and Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:8023821.
253. Marsell R, Sisask G, Nilsson Y, Sundgren-Andersson AK, Andersson U, Larsson S, *et al*. GSK-3 inhibition by an orally active small molecule increases bone mass in rats. *Bone*. 2012;50(3):619-27.
254. Martelli L, Ragazzi E, Di Mario F, Basato M, Martelli M. Cisplatin and oxaliplatin cytotoxic effects in sensitive and cisplatin-resistant human cervical tumor cells: time and mode of application dependency. *Anticancer Res*. 2009;29(10):3931-7.
255. Martens S, Nakamura S, Yoshimori T. Phospholipids in Autophagosome Formation and Fusion. *J Mol Biol*. 2016.
256. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Gines A, Ruiz de Porras V, Moutinho C, Layos L, *et al*. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(8):1767-76.
257. Masuda S. Notch1 and Notch2 have opposite prognostic effects on patients with colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2011;22(11):2533-4; author reply 4.
258. McAuliffe SM, Morgan SL, Wyant GA, Tran LT, Muto KW, Chen YS, *et al*. Targeting Notch, a key pathway for ovarian cancer stem cells, sensitizes tumors to platinum therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):E2939-48.
259. McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem*. 2003;278(25):23196-203.
260. Meng RD, Shelton CC, Li YM, Qin LX, Notterman D, Paty PB, *et al*. gamma-Secretase inhibitors abrogate oxaliplatin-induced activation of the Notch-1 signaling pathway in colon cancer cells resulting in enhanced chemosensitivity. *Cancer Res*. 2009;69(2):573-82.
261. Mercer TJ, Gubas A, Tooze SA. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *J Biol Chem*. 2018;293(15):5386-95.
262. Mi K, Johnson GV. Regulated proteolytic processing of LRP6 results in release of its intracellular domain. *J Neurochem*. 2007;101(2):517-29.
263. Storosios žarnos vėžio diagnostika ir gydymas [Website]. Vilnius: Lietuvos respublikos sveikatos apsaugos ministerija; 2014 [atnaujinta 2015 05 04; cituota 2019 05 11]. Adresas: <https://sam.lrv.lt/diagnostikos-gydymo-metodikos-ir-rekomendacijos/diagnostikos-ir-gydymo-protokolai>.
264. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. *Oncol Res*. 2001;12(11-12):469-76.
265. Mo P, Zhou Q, Guan L, Wang Y, Wang W, Miao M, *et al*. Amplified in breast cancer 1 promotes colorectal cancer progression through enhancing notch signaling. *Oncogene*. 2015;34(30):3935-45.
266. Molino D, Zemirli N, Codogno P, Morel E. The Journey of the Autophagosome through Mammalian Cell Organelles and Membranes. *J Mol Biol*. 2017;429(4):497-514.
267. Moloney DJ, Panin VM, Johnston SH, Chen J, Shao L, Wilson R, *et al*. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature*. 2000;406(6794):369-75.
268. Mrakovcic M, Frohlich LF. p53-Mediated Molecular Control of Autophagy in Tumor Cells. *Biomolecules*. 2018;8(2).
269. Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, *et al*. A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1. *Mol Cell*. 2000;5(2):197-206.
270. Mungamuri SK, Yang X, Thor AD, Somasundaram K. Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53. *Cancer Res*. 2006;66(9):4715-24.

271. Nager M, Sallan MC, Visa A, Pushparaj C, Santacana M, Macia A, *et al.* Inhibition of WNT-CTNNB1 signaling upregulates SQSTM1 and sensitizes glioblastoma cells to autophagy blockers. *Autophagy*. 2018;14(4):619-36.
272. Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem*. 2013;55:39-50.
273. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*. 2016;163:94-108.
274. Natsumeda M, Maitani K, Liu Y, Miyahara H, Kaur H, Chu Q, *et al.* Targeting Notch Signaling and Autophagy Increases Cytotoxicity in Glioblastoma Neurospheres. *Brain Pathol*. 2016;26(6):713-23.
275. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, *et al.* DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*. 2004;23(52):8520-6.
276. Nile AH, Hannoush RN. Fatty acylation of Wnt proteins. *Nat Chem Biol*. 2016;12(2):60-9.
277. Noda N, Honma S, Ohmiya Y. Hes1 is required for contact inhibition of cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Cells*. 2011;16(6):704-13.
278. Noda T, Nagano H, Takemasa I, Yoshioka S, Murakami M, Wada H, *et al.* Activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway induces chemoresistance to interferon-alpha/5-fluorouracil combination therapy for hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2009;100(10):1647-58.
279. Novellasademunt L, Antas P, Li VS. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015;309(8):C511-21.
280. Ntziachristos P, Lim JS, Sage J, Aifantis I. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer Cell*. 2014;25(3):318-34.
281. O'Donovan TR, O'Sullivan GC, McKenna SL. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy*. 2011;7(5):509-24.
282. Oguri T, Bessho Y, Achiwa H, Ozasa H, Maeno K, Maeda H, *et al.* MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(1):122-7.
283. Ohashi S, Kikuchi O, Tsurumaki M, Nakai Y, Kasai H, Horimatsu T, *et al.* Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(8):e103126.
284. Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Mol Cell Biol*. 1998;18(4):2077-88.
285. Ozawa T, Kazama S, Akiyoshi T, Muroto K, Yoneyama S, Tanaka T, *et al.* Nuclear Notch3 expression is associated with tumor recurrence in patients with stage II and III colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(8):2650-8.
286. Palaga T, Ratanabunyoung S, Pattarakankul T, Sangphech N, Wongchana W, Hadae Y, *et al.* Notch signaling regulates expression of Mcl-1 and apoptosis in PPD-treated macrophages. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(5):444-52.
287. Palermo R, Checquolo S, Giovenco A, Grazioli P, Kumar V, Campese AF, *et al.* Acetylation controls Notch3 stability and function in T-cell leukemia. *Oncogene*. 2012;31(33):3807-17.
288. Palmieri M, Impey S, Kang H, di Ronza A, Pelz C, Sardiello M, *et al.* Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum Mol Genet*. 2011;20(19):3852-66.
289. Palomero T, Dominguez M, Ferrando AA. The role of the PTEN/AKT Pathway in NOTCH1-induced leukemia. *Cell Cycle*. 2008;7(8):965-70.
290. Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, *et al.* NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18261-6.

291. Pan T, Xu J, Zhu Y. Self-renewal molecular mechanisms of colorectal cancer stem cells. *Int J Mol Med*. 2017;39(1):9-20.
292. Panczyk M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World J Gastroenterol*. 2014;20(29):9775-827.
293. Pandurangan AK, Divya T, Kumar K, Dineshababu V, Velavan B, Sudhandiran G. Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. *World J Gastrointest Oncol*. 2018;10(9):244-59.
294. Paquette M, El-Houjeiri L, Pause A. mTOR Pathways in Cancer and Autophagy. *Cancers (Basel)*. 2018;10(1).
295. Park JM, Huang S, Wu TT, Foster NR, Sinicrope FA. Prognostic impact of Beclin 1, p62/sequestosome 1 and LC3 protein expression in colon carcinomas from patients receiving 5-fluorouracil as adjuvant chemotherapy. *Cancer Biol Ther*. 2013;14(2):100-7.
296. Park JT, Chen X, Trope CG, Davidson B, Shih Ie M, Wang TL. Notch3 overexpression is related to the recurrence of ovarian cancer and confers resistance to carboplatin. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1087-94.
297. Park JT, Shih Ie M, Wang TL. Identification of Pbx1, a potential oncogene, as a Notch3 target gene in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2008;68(21):8852-60.
298. Pattison JS, Osinska H, Robbins J. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ Res*. 2011;109(2):151-60.
299. Perumalsamy LR, Nagala M, Sarin A. Notch-activated signaling cascade interacts with mitochondrial remodeling proteins to regulate cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6882-7.
300. Pettersen HS, Visnes T, Vagbo CB, Svaasand EK, Doseth B, Slupphaug G, *et al*. UNG-initiated base excision repair is the major repair route for 5-fluorouracil in DNA, but 5-fluorouracil cytotoxicity depends mainly on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(19):8430-44.
301. Pettersson S, Sczaniecka M, McLaren L, Russell F, Gladstone K, Hupp T, *et al*. Non-degradative ubiquitination of the Notch1 receptor by the E3 ligase MDM2 activates the Notch signalling pathway. *Biochem J*. 2013;450(3):523-36.
302. Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, *et al*. Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(5):310-22.
303. Poellinger L, Lendahl U. Modulating Notch signaling by pathway-intrinsic and pathway-extrinsic mechanisms. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(5):449-54.
304. Popko-Scibor AE, Lindberg MJ, Hansson ML, Holmlund T, Wallberg AE. Ubiquitination of Notch1 is regulated by MAML1-mediated p300 acetylation of Notch1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;416(3-4):300-6.
305. Port F, Basler K. Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic*. 2010;11(10):1265-71.
306. Punt CJ, Tol J. More is less -- combining targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(12):731-3.
307. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther*. 2002;1(3):227-35.
308. Ranganathan P, Vasquez-Del Carpio R, Kaplan FM, Wang H, Gupta A, VanWye JD, *et al*. Hierarchical phosphorylation within the ankyrin repeat domain defines a phosphoregulatory loop that regulates Notch transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2011;286(33):28844-57.
309. Rasmussen ML, Ortolano NA, Romero-Morales AI, Gama V. Wnt Signaling and Its Impact on Mitochondrial and Cell Cycle Dynamics in Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel)*. 2018;9(2).
310. Rauen T, Raffetseder U, Frye BC, Djudjaj S, Muhlenberg PJ, Eitner F, *et al*. YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation. *J Biol Chem*. 2009;284(39):26928-40.

311. Razaghi A, Heimann K, Schaeffer PM, Gibson SB. Negative regulators of cell death pathways in cancer: perspective on biomarkers and targeted therapies. *Apoptosis*. 2018;23(2):93-112.
312. Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res*. 1999;59(16):3968-71.
313. Rehman M, Gurrapu S, Cagnoni G, Capparuccia L, Tamagnone L. PlexinD1 Is a Novel Transcriptional Target and Effector of Notch Signaling in Cancer Cells. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164660.
314. Reidy K, Campanile C, Muff R, Born W, Fuchs B. mTHPC-mediated photodynamic therapy is effective in the metastatic human 143B osteosarcoma cells. *Photochem Photobiol*. 2012;88(3):721-7.
315. Riddell IA. Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci*. 2018;18.
316. Roberts DL, Williams KJ, Cowen RL, Barathova M, Eustace AJ, Brittain-Dissont S, *et al*. Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2009;101(8):1290-7.
317. Rodilla V, Villanueva A, Obrador-Hevia A, Robert-Moreno A, Fernandez-Majada V, Grilli A, *et al*. Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(15):6315-20.
318. Roy S, Majumdar AP. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal*. 2012;7(1):11.
319. Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, *et al*. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*. 1999;285(5435):1923-6.
320. Ross DA, Kadesch T. The notch intracellular domain can function as a coactivator for LEF-1. *Mol Cell Biol*. 2001;21(22):7537-44.
321. Sabatino L, Pancione M, Votino C, Colangelo T, Lupo A, Novellino E, *et al*. Emerging role of the beta-catenin-PPARgamma axis in the pathogenesis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7137-51.
322. Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer. *Cancer J*. 2010;16(3):196-201.
323. Santio NM, Landor SK, Vahtera L, Yla-Pelto J, Paloniemi E, Imanishi SY, *et al*. Phosphorylation of Notch1 by Pim kinases promotes oncogenic signaling in breast and prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(28):43220-38.
324. Sarin A, Marcel N. The NOTCH1-autophagy interaction: Regulating self-eating for survival. *Autophagy*. 2017;13(2):446-7.
325. Sasnauskienė A, Kadziauskas J, Vezelyte N, Jonusiene V, Kirveliėne V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis*. 2009;14(3):276-86.
326. Sawaguchi S, Varshney S, Ogawa M, Sakaidani Y, Yagi H, Takeshita K, *et al*. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. *Elife*. 2017;6.
327. Schmole AC, Brennfuhrer A, Karapetyan G, Jaster R, Pews-Davtyan A, Hubner R, *et al*. Novel indolylmaleimide acts as GSK-3beta inhibitor in human neural progenitor cells. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(18):6785-95.
328. Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. Wnt Signaling in Cell Motility and Invasion: Drawing Parallels between Development and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2016;8(9).
329. Sekine S, Shibata T, Sakamoto M, Hirohashi S. Target disruption of the mutant beta-catenin gene in colon cancer cell line HCT116: preservation of its malignant phenotype. *Oncogene*. 2002;21(38):5906-11.
330. Selvakumaran M, Amaravadi RK, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Autophagy inhibition sensitizes colon cancer cells to antiangiogenic and cytotoxic therapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(11):2995-3007.

331. Senge MO, Brandt JC. Temoporfin (Foscan(R), 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer. *Photochem Photobiol.* 2011;87(6):1240-96.
332. Serafin V, Persano L, Moserle L, Esposito G, Ghisi M, Curtarello M, *et al.* Notch3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer. *J Pathol.* 2011;224(4):448-60.
333. Serth K, Schuster-Gossler K, Kremmer E, Hansen B, Marohn-Kohn B, Gossler A. O-fucosylation of DLL3 is required for its function during somitogenesis. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123776.
334. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science.* 2011;332(6036):1429-33.
335. Shaya O, Binshtok U, Hersch M, Rivkin D, Weinreb S, Amir-Zilberstein L, *et al.* Cell-Cell Contact Area Affects Notch Signaling and Notch-Dependent Patterning. *Dev Cell.* 2017;40(5):505-11 e6.
336. Shao X, Ding Z, Zhao M, Liu K, Sun H, Chen J, *et al.* Mammalian Numb protein antagonizes Notch by controlling postendocytic trafficking of the Notch ligand Delta-like 4. *J Biol Chem.* 2017;292(50):20628-43.
337. Sharghi-Namini S, Tan E, Ong LL, Ge R, Asada HH. Dll4-containing exosomes induce capillary sprout retraction in a 3D microenvironment. *Sci Rep.* 2014;4:4031.
338. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, *et al.* New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood.* 2010;116(13):2385-94.
339. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291(4):775-9.
340. Shin S, Wolgamott L, Yu Y, Blenis J, Yoon SO. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 promotes p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(47):E1204-13.
341. Siebel C, Lendahl U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol Rev.* 2017;97(4):1235-94.
342. Simon HU, Friis R, Tait SW, Ryan KM. Retrograde signaling from autophagy modulates stress responses. *Sci Signal.* 2017;10(468).
343. Sivasankaran B, Degen M, Ghaffari A, Hegi ME, Hamou MF, Ionescu MC, *et al.* Tenascin-C is a novel RBPJkappa-induced target gene for Notch signaling in gliomas. *Cancer Res.* 2009;69(2):458-65.
344. Sjoqvist M, Andersson ER. Do as I say, Not(ch) as I do: Lateral control of cell fate. *Dev Biol.* 2017.
345. Slusarski DC, Pelegri F. Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol.* 2007;307(1):1-13.
346. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76-85.
347. Soltanian S, Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol.* 2011;32(3):425-40.
348. Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, *et al.* Suppression of colon cancer metastasis by Aes through inhibition of Notch signaling. *Cancer Cell.* 2011;19(1):125-37.
349. Sorensen EB, Conner SD. gamma-secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane. *Traffic.* 2010;11(9):1234-45.
350. Spring BQ, Rizvi I, Xu N, Hasan T. The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance. *Photochem Photobiol Sci.* 2015;14(8):1476-91.
351. Stahl M, Uemura K, Ge C, Shi S, Tashima Y, Stanley P. Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J Biol Chem.* 2008;283(20):13638-51.

352. Steg AD, Katre AA, Goodman B, Han HD, Nick AM, Stone RL, *et al.* Targeting the notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(17):5674-85.
353. Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res.* 2006;66(3):1517-25.
354. Struhl G, Adachi A. Requirements for presenilin-dependent cleavage of notch and other transmembrane proteins. *Mol Cell.* 2000;6(3):625-36.
355. Su HY, Lai HC, Lin YW, Liu CY, Chen CK, Chou YC, *et al.* Epigenetic silencing of SFRP5 is related to malignant phenotype and chemoresistance of ovarian cancer through Wnt signaling pathway. *Int J Cancer.* 2010;127(3):555-67.
356. Sugiyama K, Nishide K, Matsuo H, Okigawa S, Okano M, Ishitani T, *et al.* Delta1 family members are involved in filopodial actin formation and neuronal cell migration independent of Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;398(1):118-24.
357. Sugiyama M, Oki E, Nakaji Y, Tsutsumi S, Ono N, Nakanishi R, *et al.* High expression of the Notch ligand Jagged-1 is associated with poor prognosis after surgery for colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2016;107(11):1705-16.
358. Sun C, Wang FJ, Zhang HG, Xu XZ, Jia RC, Yao L, *et al.* miR-34a mediates oxaliplatin resistance of colorectal cancer cells by inhibiting macroautophagy via transforming growth factor-beta/Smad4 pathway. *World J Gastroenterol.* 2017a;23(10):1816-27.
359. Sun L, Ke J, He Z, Chen Z, Huang Q, Ai W, *et al.* HES1 Promotes Colorectal Cancer Cell Resistance To 5-Fu by Inducing Of EMT and ABC Transporter Proteins. *J Cancer.* 2017b;8(14):2802-8.
360. Suzuki T, Bridges D, Nakada D, Skiniotis G, Morrison SJ, Lin JD, *et al.* Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3. *Mol Cell.* 2013;50(3):407-19.
361. Sweeney C, Morrow D, Birney YA, Coyle S, Hennessy C, Scheller A, *et al.* Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway. *FASEB J.* 2004;18(12):1421-3.
362. Szarynska M, Olejniczak A, Kobiela J, Spsychalski P, Kmiec Z. Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(6):7653-68.
363. Tadini-Buoninsegni F, Bartolommei G, Moncelli MR, Inesi G, Galliani A, Sinisi M, *et al.* Translocation of platinum anticancer drugs by human copper ATPases ATP7A and ATP7B. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014;53(5):1297-301.
364. Tagami S, Okochi M, Yanagida K, Ikuta A, Fukumori A, Matsumoto N, *et al.* Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1. *Mol Cell Biol.* 2008;28(1):165-76.
365. Takeuchi H, Haltiwanger RS. Significance of glycosylation in Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;453(2):235-42.
366. Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y. Skeletrophin, a novel ubiquitin ligase to the intracellular region of Jagged-2, is aberrantly expressed in multiple myeloma. *Am J Pathol.* 2005;166(6):1817-26.
367. Tamagnone L, Zacchigna S, Rehman M. Taming the Notch Transcriptional Regulator for Cancer Therapy. *Molecules.* 2018;23(2).
368. Tan VP, Miyamoto S. Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;95:31-41.
369. Tanaka T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog.* 2009;8:5.
370. Taranets L, Zhu J, Xu W, Popov N. Fbw7 and Usp28 - enemies and allies. *Mol Cell Oncol.* 2015;2(3):e995041.
371. Teiten MH, Bezdetnaya L, Morliere P, Santus R, Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer.* 2003;88(1):146-52.



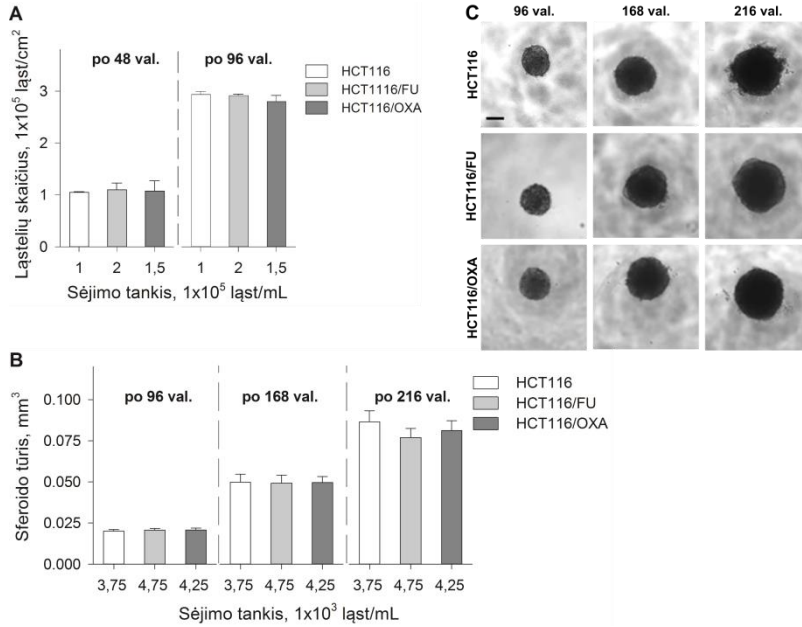
372. Temraz S, Mukherji D, Alameddine R, Shamseddine A. Methods of overcoming treatment resistance in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;89(2):217-30.
373. ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E, Nusse R. Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell*. 2008;3(5):508-18.
374. Thanki K, Nicholls ME, Gajjar A, Senagore AJ, Qiu S, Szabo C, *et al*. Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer and their Clinical Implications. *Int Biol Biomed J*. 2017;3(3):105-11.
375. Timme CR, Gruidl M, Yeatman TJ. Gamma-secretase inhibition attenuates oxaliplatin-induced apoptosis through increased Mcl-1 and/or Bcl-xL in human colon cancer cells. *Apoptosis*. 2013;18(10):1163-74.
376. To KK, Poon DC, Wei Y, Wang F, Lin G, Fu LW. Data showing the circumvention of oxaliplatin resistance by vatalanib in colon cancer. *Data Brief*. 2016;7:437-44.
377. To MD, Gokgoz N, Doyle TG, Donoviel DB, Knight JA, Hyslop PS, *et al*. Functional characterization of novel presenilin-2 variants identified in human breast cancers. *Oncogene*. 2006;25(25):3557-64.
378. Tortelote GG, Reis RR, de Almeida Mendes F, Abreu JG. Complexity of the Wnt/betacatenin pathway: Searching for an activation model. *Cell Signal*. 2017;40:30-43.
379. Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1369-79.
380. Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*. 2011;136(3):473-8.
381. Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, Ninomiya H, *et al*. Characterization of sequential N-cadherin cleavage by ADAM10 and PS1. *Neurosci Lett*. 2006;402(3):278-83.
382. Ungerback J, Elander N, Grunberg J, Sigvardsson M, Soderkvist P. The Notch-2 gene is regulated by Wnt signaling in cultured colorectal cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(3):e17957.
383. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data [duomenų bazė internete]. the UniProt consortium. Sukurta 2002 [cituota 2018 07 11]. Adresas: <https://www.uniprot.org/>.
384. Vaish V, Kim J, Shim M. Jagged-2 (JAG2) enhances tumorigenicity and chemoresistance of colorectal cancer cells. *Oncotarget*. 2017;8(32):53262-75.
385. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241-60.
386. Venkatesh V, Nataraj R, Thangaraj GS, Karthikeyan M, Gnanasekaran A, Kaginelli SB, *et al*. Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem Cell Investig*. 2018;5:5.
387. Ventura JJ, Hubner A, Zhang C, Flavell RA, Shokat KM, Davis RJ. Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell*. 2006;21(5):701-10.
388. Villa JC, Chiu D, Brandes AH, Escorcía FE, Villa CH, Maguire WF, *et al*. Nontranscriptional role of Hif-1alpha in activation of gamma-secretase and notch signaling in breast cancer. *Cell Rep*. 2014;8(4):1077-92.
389. Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat AM, Chambaz J, *et al*. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer*. 2002;98(4):498-504.
390. Wacker SA, Alvarado C, von Wichert G, Knippschild U, Wiedenmann J, Clauss K, *et al*. RITA, a novel modulator of Notch signalling, acts via nuclear export of RBP-J. *EMBO J*. 2011;30(1):43-56.

391. Wang H, Zang C, Liu XS, Aster JC. The role of Notch receptors in transcriptional regulation. *J Cell Physiol.* 2015;230(5):982-8.
392. Wang HQ, Xu ML, Ma J, Zhang Y, Xie CH. Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(1):62-6.
393. Wang Y. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(8):2103-9.
394. Wang Y, Wang H, Ge H, Yang Z. AG-1031 induced autophagic cell death and apoptosis in C6 glioma cells associated with Notch-1 signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2018;119(7):5893-903.
395. Wang Q, Shi Y, Butler HJ, Xue J, Wang G, Duan P, *et al.* Role of delta-like ligand-4 in chemoresistance against docetaxel in MCF-7 cells. *Hum Exp Toxicol.* 2017a;36(4):328-38.
396. Wang W, Wang L, Mizokami A, Shi J, Zou C, Dai J, *et al.* Down-regulation of E-cadherin enhances prostate cancer chemoresistance via Notch signaling. *Chin J Cancer.* 2017b;36(1):35.
397. Wang WJ, Yao Y, Jiang LL, Hu TH, Ma JQ, Ruan ZP, *et al.* Increased LEF1 expression and decreased Notch2 expression are strong predictors of poor outcomes in colorectal cancer patients. *Dis Markers.* 2013;35(5):395-405.
398. Wang Z, Li Y, Ahmad A, Azmi AS, Banerjee S, Kong D, *et al.* Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1806(2):258-67.
399. Weaver KL, Alves-Guerra MC, Jin K, Wang Z, Han X, Ranganathan P, *et al.* NACK is an integral component of the Notch transcriptional activation complex and is critical for development and tumorigenesis. *Cancer Res.* 2014;74(17):4741-51.
400. Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, *et al.* c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes Dev.* 2006;20(15):2096-109.
401. Whelan JT, Forbes SL, Bertrand FE. CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle.* 2007;6(1):80-4.
402. Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol.* 2002;2:8.
403. Windler SL, Bilder D. Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling. *Curr Biol.* 2010;20(6):538-43.
404. Wyatt MD, Wilson DM, 3rd. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(5):788-99.
405. Wu WK, Wang XJ, Cheng AS, Luo MX, Ng SS, To KF, *et al.* Dysregulation and crosstalk of cellular signaling pathways in colon carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;86(3):251-77.
406. Wu WR, Zhang R, Shi XD, Yi C, Xu LB, Liu C. Notch2 is a crucial regulator of self-renewal and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2016a;36(1):181-8.
407. Wu WR, Zhang R, Shi XD, Zhu MS, Xu LB, Zeng H, *et al.* Notch1 is overexpressed in human intrahepatic cholangiocarcinoma and is associated with its proliferation, invasiveness and sensitivity to 5-fluorouracil in vitro. *Oncol Rep.* 2014;31(6):2515-24.
408. Wu X, Fleming A, Ricketts T, Pavel M, Virgin H, Menzies FM, *et al.* Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nat Commun.* 2016b;7:10533.
409. Wu X, Lee H. Human Dbf4/ASK promoter is activated through the Sp1 and MluI cell-cycle box (MCB) transcription elements. *Oncogene.* 2002;21(51):7786-96.
410. Wu X, Luo F, Li J, Zhong X, Liu K. Tankyrase 1 inhibitor XAV939 increases chemosensitivity in colon cancer cell lines via inhibition of the Wnt signaling pathway. *Int J Oncol.* 2016c;48(4):1333-40.

411. Wu ZQ, Brabletz T, Fearon E, Willis AL, Hu CY, Li XY, *et al.* Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(28):11312-7.
412. Xu X, Choi SH, Hu T, Tiyanont K, Habets R, Groot AJ, *et al.* Insights into Autoregulation of Notch3 from Structural and Functional Studies of Its Negative Regulatory Region. *Structure.* 2015;23(7):1227-35.
413. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem.* 2017;61(6):585-96.
414. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C, Zamagni A, Santi S, Polico R, *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep.* 2016;6:19103.
415. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2017;36(11):1461-73.
416. Zhang C, Li W, Wen J, Yang Z. Autophagy is involved in mouse kidney development and podocyte differentiation regulated by Notch signalling. *J Cell Mol Med.* 2017a;21(7):1315-28.
417. Zhang H, Liu L, Liu C, Pan J, Lu G, Zhou Z, *et al.* Notch3 overexpression enhances progression and chemoresistance of urothelial carcinoma. *Oncotarget.* 2017b;8(21):34362-73.
418. Zhang Y, Li B, Ji ZZ, Zheng PS. Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer.* 2010a;116(22):5207-18.
419. Zhang P, Yang Y, Nolo R, Zweidler-McKay PA, Hughes DP. Regulation of NOTCH signaling by reciprocal inhibition of HES1 and Deltex 1 and its role in osteosarcoma invasiveness. *Oncogene.* 2010b;29(20):2916-26.
420. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, *et al.* Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61(24):8664-7.
421. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* 2013;4:e532.
422. Zheng CG, Chen R, Xie JB, Liu CB, Jin Z, Jin C. Immunohistochemical expression of Notch1, Jagged1, NF-kappaB and MMP-9 in colorectal cancer patients and the relationship to clinicopathological parameters. *Cancer Biomark.* 2015;15(6):889-97.
423. Zimmer-Strobl U, Strobl LJ, Meitingner C, Hinrichs R, Sakai T, Furukawa T, *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of *Drosophila* Suppressor of Hairless. *EMBO J.* 1994;13(20):4973-82.
424. Zou M, Hu C, You Q, Zhang A, Wang X, Guo Q. Oroxylin A induces autophagy in human malignant glioma cells via the mTOR-STAT3-Notch signaling pathway. *Mol Carcinog.* 2015;54(11):1363-75.

# PRIEDAI

## 1 PRIEDAS



**1 P pav.** HCT116, HCT116/FU, HCT116/OXA ląstelių skaičius monoslauksnio eksperimentuose (A), sferoidų tūris (B) ir nuotraukos (C). Brūkšniai –  $\pm$ SN. Mastelio juosta – 200  $\mu$ m.  $n \geq 3$ .

## 2 PRIEDAS

2P lentelė. Regresinės analizės metu gautos lygtys, kurios aprašo ląstelių gyvybingumo (y) priklausomybę nuo 5-FU arba OxaPt koncentracijos (x). Monosluoksniu modelyje x matavimo vienetas mM, o sferoidų – μM

Ląstelių linija	Vaistas	Modelis	Kreivės lygtis	R <sup>2</sup>
HCT116	5-FU	Monosluoksniu	$y = -13,41 \ln(x) + 18,609$	0,9780
		Sferoidai	$y = -34,18 \ln(x) + 90,738$	0,9976
	OxaPt	Monosluoksniu	$y = -14,18 \ln(x) + 5,7448$	0,9921
		Sferoidai	$y = -37,58 \ln(x) + 68,886$	0,9718
HCT116/FU	5-FU	Monosluoksniu	$y = -10,41 \ln(x) + 50,229$	0,9720
		Sferoidai	$y = -23,92 \ln(x) + 88,365$	0,9721
	OxaPt	Monosluoksniu	$y = -13,89 \ln(x) + 4,7066$	0,9684
		Sferoidai	$y = -47,91 \ln(x) + 58,266$	0,9972
HCT116/OXA	5-FU	Monosluoksniu	$y = -10,16 \ln(x) + 55,082$	0,9837
		Sferoidai	$y = -24,28 \ln(x) + 86,795$	0,9935
	OxaPt	Monosluoksniu	$y = 108,65x^2 - 176x + 91,363$	0,9966
		Sferoidai	$y = -32,41 \ln(x) + 153,67$	0,9862

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

**Kukcinaviciute E**, Sasnauskiene A, Dabkeviciene D, Kirvelienu V, Jonusienu V. Effect of mTHPC-mediated photodynamic therapy on 5-fluorouracil resistant human colorectal cancer cells. *Photochem Photobiol Sci.* 2017 Jul 1;16(7):1063-1070.

**Kukcinaviciute E**, Jonusienu V, Sasnauskienu A, Dabkevicienu D, Eidenaitu E, Laurinavicius A. Significance of Notch and Wnt signaling for chemoresistance of colorectal cancer cells HCT116. *J Cell Biochem.* 2018 Jul;119(7):5913-5920.

## PRISTATYMAI KONFERENCIJOSE

**Kukcinaviciute E**, Jonusienu V, Sasnauskienu A, Kirvelienu V. The effects of mTHPC-PDT to chemo-resistant human colorectal carcinoma cells HCT116. XIV International Conference of Lithuanian Biochemical Society, June 28-30, 2016, in Druskininkai, Lithuania.

**Kukcinaviciute E**, Jonusienu V, Sasnauskienu A, Kirvelienu V. The impact of mTHPC-PDT and 5-fluorouracil on autophagic flux in chemoresistant human colorectal carcinoma cells HCT116. *Life Sciences Baltics 2016*, September 14-15, 2016, Vilnius, Lithuania.

**Kukcinaviciute E**, Eidenaitu E, Jonusienu V, Sasnauskienu A, Dabkevicienu D, Laurinavicius A. The role of Notch signaling for chemoresistance of colorectal cancer cells HCT116 in 2D and 3D culture models. *Cellular signaling and cancer therapy*, September 14-18, 2018, Cavtat, Croatia.

Zitkute V, **Kukcinaviciute E**, Dabkevicienu D, Jonusienu V, Starkuvienu V, Sasnauskienu A. The effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin on Autophagy in Chemoresistant Colorectal Carcinoma Cells HCT116. *The Coins*, February 26-28, 2019, Vilnius, Lithuania.

## PADEKA

Noriu nuoširdžiai padėkoti visiems, kurie man padėjo bei palaikė doktorantūros studijų metu.

Pirmiausiai dėkoju abiem mano darbo vadovėms – prof. dr. Vidai Kirvelienei už galimybę dirbti ląstelių biochemijos laboratorijoje, skatinimą tobulėti bei dr. Aušrai Sasnauskienei už puikų vadovavimą ir palaikymą.

Ačiū visam ląstelių biochemijos laboratorijos kolektyvui už pagalbą, įdomias diskusijas, naudingus patarimus bei puikią atmosferą. Ypač dėkoju dr. Daivai Dabkevičienei už patarimus bei pagalbą biostatistikos klausimais, dr. Violetai Jonušienei už visokeriopą pagalbą ruošiant publikacijas, Vidai Piskarskienei už pasirūpinimą, kad niekada netrūktų ląstelių kultivavimui reikalingų tirpalų, Neringai Daugelavičienei už draugiškumą bei išklausymą, Eigilei Eidėnaitei ir Vilmantei Žitkutei už pagalbą atliekant eksperimentus, smagų darbą ir šiltą bendravimą.

Taip pat dėkoju žmonėms, kurie suteikė galimybę naudotis įvairia laboratorine įranga: prof. dr. Editai Sužiedelienei už galimybę naudotis NanoDrop, dr. Danutei Labeikytei – spektrofotometru, Aurimui Stulpinui – fluorimetru, Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus kolektyvui – mikroskopu.

Valstybinio patalogijos centro direktoriui prof. dr. Arvydui Laurinavičiui už galimybę dirbti projekte.

Ačiū Mildai už išklausymą, patarimus ir palaikymą.

Labai dėkoju tėvams ir sesei už palaikymą. Ypatingas ačiū Lukui už kantrybę ir besąlygišką palaikymą, be kurio šis kelias būtų daug sunkesnis.

## CURRICULUM VITAE

<b>Vardas</b>	Eglė
<b>Pavardė</b>	Kukcinavičiūtė
<b>Gimimo data</b>	1990-05-07
<b>Adresas</b>	Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas Vilniaus universitetas Saulėtekio 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva tel.: +37052234436 e-paštas: egle.kukcinaviciute@gmail.com
<b>Išsilavinimas</b>	
2014 – 2018	doktorantė, Biochemija
2014	Biochemijos magistras, Vilniaus universitetas
2012	Biochemijos bakalauras, Vilniaus universitetas
<b>Darbo patirtis</b>	
2012 rugsėjis – 2019 vasaris	Specialistė, VU Gyvybės mokslų centras, Biomokslų institutas, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra (iki 2012 spalio Biochemijos ir biofizikos katedra, nuo 2012 spalio Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra, kuri nuo 2016 lapkričio tapo Biomokslų instituto dalimi)
2017 sausis – 2018 gruodis	Tyrėja projekte “Nauji žymenys storosios žarnos vėžio individualizuotai terapijai: proteomika, mikroRNRomika, klinika“, VU Medicinos fakultetas, Patologijos, teismo medicinos ir farmakologijos katedra
<b>Moksliniai interesai</b>	Ląstelių biologija ir biochemija



# UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla  
Universiteto g. 1, LT-01513 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt),  
[www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
Tiražas 20 egz.