

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Nadežda
DREIŽĖ

Navikinių ląstelių atsparumo
vaistams molekulinų mechanizmų
kompleksiškumo tyrimas terapijos
veiksmingumo gerinimui

DAKTARO DISERTACIJOS SANTRAUKA

Gamtos mokslai,
Biochemija N004

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2015–2019 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Proteomikos centre.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba (doktorantūra buvo finansuojama ES struktūrinių fondų lėšomis).

Mokslinis vadovas:

Dr. Mindaugas Valius (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija N004).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – **prof. dr. Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N004).

Nariai:

dr. Eglė Balčiūnaitė (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biochemija, N004);

prof. dr. Gediminas Čepinskas (Lavsono sveikatos tyrimų institutas, Kanada, gamtos mokslai, biochemija, N004);

dr. Aušra Imbrasaitė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N004);

dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelbergo universitetas, Vokietija, gamtos mokslai, biochemija, N004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. liepos mėn. 1 d. 15 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, LT-10257; tel. +37052234420; el. paštas www.gmc.vu.lt .

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

VILNIUS UNIVERSITY

Nadežda
DREIŽĖ

Elucidation of the complexity of
molecular mechanisms of cancer
cell drug resistance to enhance
treatment efficiency

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biochemistry N004

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2015 and 2019 at Proteomics Center, Institute of Biochemistry, Life Sciences Center, Vilnius University.

The research was supported by the Research Council of Lithuania (doctoral studies were financed from the EU structural funds).

Academic supervisor:

Dr. Mindaugas Valius (Vilnius University, natural sciences, biochemistry N004).

Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Saulius Serva (Vilnius University, natural sciences, biochemistry N004).

Members:

Dr. Eglė Balčiūnaitė (National Cancer Institute, natural sciences, biochemistry N004);

Prof. Dr. Gediminas Čepinskas (Lawson Health Research Institute, Canada, natural sciences, biochemistry N004);

Dr. Aušra Imbrasaitė (Vilnius University, natural sciences, biochemistry N004);

Dr. Vytautė Starkuvienė-Erfle (Heidelberg University, natural sciences, biochemistry N004).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 3 p.m. on the 1st of July 2020 in Room R-401 of the Vilnius University Life Sciences Center.

Address: Sauletekio av. 7, Vilnius, LT-10257, Lithuania

Tel. +37052234420; e-mail: www.gmc.vu.lt .

The text of this dissertation can be accessed at Vilnius University library, as well as on the website of Vilnius University: www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

| | |
|--|----|
| ĮVADAS | 6 |
| MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ VERTĖ | 8 |
| GINAMIEJI TEIGINIAI | 9 |
| 1. MEDŽIAGOS IR METODAI | 10 |
| 2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS | 14 |
| 2.1. RH1 atsparių krūties vėžio ląstelių tyrimai | 14 |
| 2.2. 5-fluoruracilui atsparių kolorektalinio vėžio ląstelių tyrimai | 20 |
| 2.3. Oksaliplatinai atsparių kolorektalinio vėžio ląstelių tyrimai | 22 |
| 2.3.1. Epitelinio-mezenchiminio virsmo tyrimai oksaliplatinai atspariose ląstelėse..... | 24 |
| 2.3.2. Vėžio supresorinio baltymo p53 reikšmės atsparumui oksaliplatinai vertinimas..... | 28 |
| IŠVADOS..... | 38 |
| PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE | 39 |
| NAUDOTA LITERATŪRA | 41 |
| TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ | 44 |
| UŽRAŠAMS | 46 |

IVADAS

Ląstelių atsparumas chemoterapiniams preparatams sumažina terapijos efektyvumą ir išlieka viena iš didžiausių kliūčių atsinaujinančių vėžinių navikų gydymo procese. Navikinių ląstelių atsparumas gali būti įgimtas arba įgytas. Įgimto atsparumo atveju ląstelės pasižymi jau egzistuojančiu atsparumą lemiančiu fenotipu, kuris paverčia chemoterapiją neveiksminga. Įgytas atsparumas išsivysto dėl tam tikrų adaptyvių pokyčių ląstelėse terapijos metu ar navikinių ląstelių heterogeniškumo ir po to vykstančios atrankos vaistu leidžiančios išgyventi ir proliferuoti atsparių ląstelių populiacijai. Abiem atvejais molekulinį mechanizmų bei biologinių procesų, lemiančių atsparumą, išaiškinimas gali palengvinti tinkamos ir efektyvios terapijos parinkimą. Taip pat terapijos nukreipimas į kritinius atsparumo palaikymo procese dalyvaujančius baltymus ar signalinius kelius gali būti veiksminga individualizuotos kombinacinės taikinių terapijos strategija.

Naujausi ląstelių atsparumo priešvėžiniams preparatams tyrimai vis dažniau išryškina vėžio kamieninių ląstelių, navikinių ląstelių heterogeniškumo ir plastiškumo svarbą atsparumo išsivystymo procese. Šie procesai dažnai siejami su ląstelių atsako į genotoksinį stresą pokyčiais, išgyvenamumą ar ląstelių žūtį skatinančių signalinių kelių modifikacijomis ar ląstelių žūtį reguliuojančių baltymų neveiklumu dėl įvykusių mutacijų, baltymų aktyvumo ar raiškos pokyčių. Klinikinėje praktikoje dažniausiai atliekama onkogenų ir vėžio supresorinių baltymų mutageninė analizė dažnai yra nepakankama navikinių ląstelių atsparumo numatymui, nes neskiriama pakankamai dėmesio baltymų raiškos pokyčių, signalinių kelių reguliacijos analizei.

Didelio pajėgumo globalios proteomos, aktyvių kinazių ir baltymų fosforilavimo analizė leidžia įvertinti atsparumo įgijimo procese pakitusius molekulinis mechanizmus bei biologinius procesus. Šių mechanizmų reguliavimas vaistais arba

komplementarių biologinių procesų slopinimas gali padėti išvengti atsparumo ir išnaikinti atsparių ląstelių populiaciją taip padidinant terapijos efektyvumą bei sėkmingo gydymo tikimybę. Taip pat, išsiaiškinus atsparių ląstelių žymenis, galima tokias ląsteles vizualizuoti panaudojant konfokalinę mikroskopiją ir taip identifikuoti terapiją toleruojančių ląstelių populiaciją, kuri įprastai būna užgožta dominuojančios navikinių ląstelių populiacijos. Abi šios strategijos gali palengvinti didesniu plastiškumu pasižyminčių naviką inicijuojančių ląstelių identifikavimą ir išnaikinimą, kuris sumažintų naviko atsinaujinimo ar metastazavimo tikimybę.

Šiame darbe buvo tiriami du skirtingų vėžinių susirgimų tipai, kurie pasižymi pakankamai dideliu dažnumu, agresyvumu ir aukšta atsparumo išsivystymo tikimybe. Trigubai neigiamo krūties vėžio modeline sistema buvo pasirinkta MDA-MB-231 ląstelių linija, o kolorektalinio vėžio modeliu buvo pasirinktos HCT116 ląstelės.

Šio darbo tikslas buvo išaiškinti atsparumą lemiančius molekulinis mechanizmus ir biologinius procesus pasinaudojant didelio pajėgumo globalios proteomos, aktyvių kinazių bei baltymų fosforilinimo analizėmis. Taip pat patvirtinti rastus pokyčius baltymų vizualizavimo bei genetinio manipulavimo metodais.

Šiam tikslui pasiekti buvo **iškelti uždaviniai**:

- Atlikti tėvinių ir atsparių ląstelių diferencinės aktyvių kinazių bei baltymų fosforilinimo duomenų jungtinę analizę ir patvirtinti rastus pokyčius kitais metodais.

- Ištirti c-KIT-AKT-mTOR signalinio kelio aktyvacijos svarbą RH1 preparatui atsparios ląstelių populiacijos išsivystymo procese.

- Identifikuoti baltymų pokyčius 5-fluorouracilui atsparioje HCT116 ląstelių linijoje pasinaudojus globalios diferencinės proteominės analizės duomenimis bei įvertinti DNR pažaidų mastą po vaisto poveikio.

- Išsiaiškinti atsparumo oksaliplatinai išsivystymo mechanizmus sujungiant miRNomikos ir proteomikos duomenis bei ištirti tarpinio

epitelinio-mezenchiminio fenotipo reikšmę atsparumo vystymosi procese.

- Patvirtinti vėžio supresorinio baltymo p53 mutacijų svarbą atsparumui oksaliplatinai bei panaudoti CRISPR/Cas9 sistema išveiklinto p53 baltymo ląstelių linijas oksaliplatinos veikimo mechanizmo tyrimui.

MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ VERTĖ

Šiame darbe tirti atsparumo mechanizmai panaudojant du skirtingus vėžio tipus reprezentuojančias ląstelių linijas bei skirtingų veikimo mechanizmų vaistus. Pirmuoju atveju parodėme, kad eksperimentiniai priešvėžiniai preparatai specifiskai nutaikyti į vėžines ląsteles gali pasižymėti alternatyviu citotoksiniu veikimo mechanizmu ir taip sukelti pašalinius poveikius. Taip pat parodėme vėžio kamieninių ląstelių svarbą atsparumo išsivystymo procese panaudodami jungtinę aktyvių kinazių bei baltymų fosforilavimo analizę. Šis naujas metodas suteikė mums galimybę detaliau pažvelgti į ląstelių signalinių kelių pokyčius ir išryškino signalinius kelius, atsakingus už atsparių ląstelių kamieniškumo palaikymą. Remdamiesi šiais duomenimis pasiūlėme tik šiuo metu atsirandančią kamieniškumo išsivystymo slopinimo ir chemoterapinio junginio kombinacinę terapiją, kuri apsaugotų nuo atsparumo chemoterapiniam vaistui išsivystymo.

Antruoju atveju parodėme galimybę nustatyti atsparių ląstelių fenotipo pokyčius, lemiančius atsparumo išsivystymą, panaudojant globalius miRNR ir proteomos tyrimo metodus. Šio tyrimo rezultatai išryškino ląstelių atsparumą lemiantį tarpinį epitelinį-mezenchiminį fenotipą, kuris naujausių tyrimų duomenimis yra siejamas su navikinių ląstelių plastiškumu. Navikinių ląstelių plastiškumas yra vienas iš svarbių faktorių pradinuose atsparumo išsivystymo etapuose, kai randamos vaistą toleruojančios ląstelės, kurios pasižymi genetiniu nestabilumu lemiančiu onkogenų ar vėžio

supresorinių genų mutacijas ir negrįžtamo atsparumo atsiradimą. Toks atsparumo išsivystymo kelias yra tolimesnių tyrimų objektas ir gali būti pamatu efektyviam terapinių junginių parinkimui, paremtam vaisto ir ląstelių plastiškumą slopinančio junginio kombinacija. Ši strategija padidintų įprastai taikomos terapijos efektyvumą bei sėkmingo gydymo tikimybę.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Kamieninių ląstelių požymių turinčios ląstelių populiacijos padidėjimas dėl autokrininės c-KIT-AKT-mTOR signalinio kelio aktyvacijos skatina atsparumo RH1 preparatui išsivystymą ir šio proceso galima išvengti kombinuojant RH1 poveikį su kamieninių ląstelių receptoriaus c-KIT inhibicija.

2. Globalios proteominės analizės būdu nustatyti baltymų raiškos pokyčiai 5-fluoruracilui atsparioje ląstelių linijoje rodo pasikeitusį vaisto metabolizmą ir gali būti naudojami kaip 5-fluoruracilui specifinio atsparumo mechanizmo prognostiniai žymenys.

3. Atsparumas oksaliplatinai gali pasireikšti tarpiniu epiteliniu-mezenchiminiu fenotipu, reguliuojamu su epiteliniu-mezenchiminiu virsmu siejamais miRNR miR-23b bei transkripcijos veiksniumi SNAI2.

4. Mutacinė p53 baltymo būsena yra svarbus atsparumo oksaliplatinos terapijai požymis, nes transkripcijos veiksnio p53 aktyvuojami baltymai dalyvauja atsako į vaistą procesuose ir inaktyvuojančios šio vėžio supresoriaus mutacijos paverčia oksaliplatinos terapiją neefektyvia.

1. MEDŽIAGOS IR METODAI

Naudotos medžiagos ir metodai detaliai aprašyti disertacijoje ir publikuotuose straipsniuose disertacijos tema.

Ląstelių auginimas, atsparumo ir gyvybingumo matavimai.

Ląstelės auginamos naudojant standartinį ląstelių auginimo protokolą. Tyrimams naudotos žmogaus krūties adenokarcinomos ląstelės MDA-MB-231 (gautos iš ECACC) ir žmogaus kolorektalinės karcinomos ląstelės HCT116 (gautos iš ATCC).

Atsparios ląstelės selekcionuojamos pagal skirtingus protokolus. MDA-MB-231 ląstelės veikiamos eksperimentiniu preparatu RH1 2 valandų pulsais, po kurių seka atsigavimo periodas. HCT116 ląstelės nuolat auginamos terpėje su nedidele vaisto koncentracija, ją palaipsniui didinant (selekcija atlikta VU GMC BMI Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje).

Ląstelių poveikiai atliekami siekiant atkartoti chemoterapinio gydymo sąlygas. RH1 preparato atveju vykdomi 2 valandų pulsiniai poveikiai, nes per tiek laiko preparatas yra pašalinamas iš organizmo [1]. 5-fluoruracilo ir oksaliplatinos atvejais vykdomi 48 valandų poveikiai, nes tokia yra vieno chemoterapijos kurso trukmė pagal FOLFOX protokolą [2].

Ląstelių gyvybingumas matuojamas MTT testu, ląstelės membranos pralaidumą vertinančiu testu paremtu etidžio bromido ar propidžio jodido patekimo į ląstelę nustatymu tėkmės citometrijos būdu bei aktyvios kaspazės-3/7 nustatymu naudojant fluorescuojantį detekcijos reagentą CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen).

Kiti ląstelių savybių nustatymo metodai.

Ląstelių ciklo analizė vykdyta tėkmės citometrijos būdu matuojant DNR dažančio junginio, propidžio jodido, fluorescencijos

intensyvumą fiksuotose, permeabilizuotose ir RNAze paveiktose ląstelėse.

Sferų formavimo eksperimentai atlikti sėjant ląsteles agarozės pagrindu paruoštoje matricoje ant neadhezinio paviršiaus taip apribojant ląstelių-ląstelių ir ląstelių-paviršiaus sąveikas.

Žaizdos gijimo eksperimentai atlikti ląsteles sėjant 90-100% konfluencija ir padarant žaizdą. Žaizdos gijimas fiksuotas šviesiniu mikroskopu kas 24 valandas.

Baltymų vizualizacijos ir baltymų sąveikos su DNR nustatymo metodai.

Ląstelių lizatuose baltymai vizualizuojami imunobloto metodu naudojant specifinius pirminius antikūnus bei fluorescuojančius infraraudonoje šviesoje arba spalvinę reakciją vykdančius antrinius antikūnus.

Baltymų sąveikos su DNR tyrimai atlikti nusodinant baltymą panaudojus biotilintus oligonukleotidus ir streptavidino agarozę kaip kietąją fazę. Nusodinti baltymai vizualizuoti imunobloto metodu.

Pavienėse ląstelėse baltymai vizualizuoti konfokalinės mikroskopijos būdu naudojant specifinius pirminius antikūnus bei fluorescuojančius antrinius antikūnus. Ląstelės ciklo S fazėje nudažytos Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit (Thermo Scientific) rinkiniu pagal gamintojo instrukcijas.

Imunofluorescentinė analizė tėkmės citometru buvo atlikta naudojant fluorescuojantį FITC-konjuguatą pirminį antikūną ir FITC-konjuguatą IgG2b antikūną izotipinei kontrolei.

Genetinės ląstelių manipuliacijos.

Siekiant išvesti ląstelių liniją indukuojamai ekspresuojančią baltymą buvo naudota trečios kartos lentivirusinė sistema. Virusų gamybai panaudota HEK293T ląstelių linija transfekuota trijų plazmidžių rinkiniu naudojant Lipofectamine 3000 reagentą (Thermo Scientific) pagal gamintojo instrukcijas. Pernešama plazmidė

koduoja indukuojamo baltymo geną ir rtTA-Advanced indukcijos sistemos komponentus. Viruso prisotinta terpė nuo virusą produkuojančių ląstelių perkelta ant taikinio ląstelių ir atlikta selekcija su selekcijos antibiotiku.

RNR interferencijos tyrimams naudota ta pati viruso produkcijos metodika kaip pernešamą plazmidę naudojant shRNR koduojančią seką, nukreiptą į norimą baltymą.

Baltymo geno išveiklinimo tyrimams naudojant CRISPR/Cas9 sistemą naudota Cas9 baltymo geną ir gidinę RNR koduojanti plazmidė. Ląstelės, pasisavinusios plazmidę, atrenkamos trumpos selekcijos metu ir išsėjamos po vieną serijinio skiedimo būdu. Užauginti klonai tikrinami ir 15 klonų neekspresuojančių tiriamo baltymo sujungti suformuojant ląstelių liniją.

RNR gryninimas, mRNR kiekio nustatymas ir miRNR tyrimai.

mRNR kiekio nustatymui RNR išskirta iš ląstelių lizatų naudojant RNR skyrimo rinkinį GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher/ThermoFisher Scientific) pagal gamintojo instrukcijas. Komplementari DNR susintetinta panaudojant RevertAid RT Kit (Thermo Fisher/ThermoFisher Scientific) rinkinį. Realaus laiko kiekybinė PGR atlikta naudojant 2x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA Biosystems) reagentą. mRNR pokyčiai vertinti $\Delta\Delta C_t$ metodu [3].

MiRNR sekvenavimas ir miRNR pokyčių validavimas atliktas VU GMC BTI DNR modifikacijos tyrimų skyriaus G.Vilkaičio grupės. MiRNR taikiniai *in silico* nustatyti naudojantis RepTar, MiRTar, MiRanda, PicTar2, MiRMap, miRTarget3, TargetScan7 ir eksperimentine miRTARbase duomenų bazėmis.

Proteominiai tyrimai ir masių spektrometrija.

Globalios proteomos nustatymui ląstelės lizuojamos, sonikuojamos ir ląstelių nuolaužos pašalinamos centrifuguojant.

Masių spektrometrijai baltymų peptidai ruošiami vadovaujantis FASP protokolu [4].

Aktyvių kinazių nustatymui naudojamos su inhibitoriais konjuguotos MIB dalelės gautos iš dr. Lee M. Graves laboratorijos (Department of Pharmacology, the University of North Carolina at Chapel Hill). Šios dalelės nusodina aktyvias kinazes ir su jomis sąveikaujančius baltymus iš ląstelių lizato.

Baltymų fosforilavimo tyrimui ląstelių lizatas yra frakcionuojamas chromatografijos būdu ir kiekviena frakcija yra praturtinama fosfopeptidais naudojant Titanium dioxide (TiO₂) Phosphopeptide Enrichment Kit (Thermo Scientific) rinkinį pagal gamintojo instrukcijas.

Funkcinė rezultatų analizė atlikta naudojant Cytoscape [5] programinę įrangą su ClueGO [6] ir CluePedia [7] papildiniais.

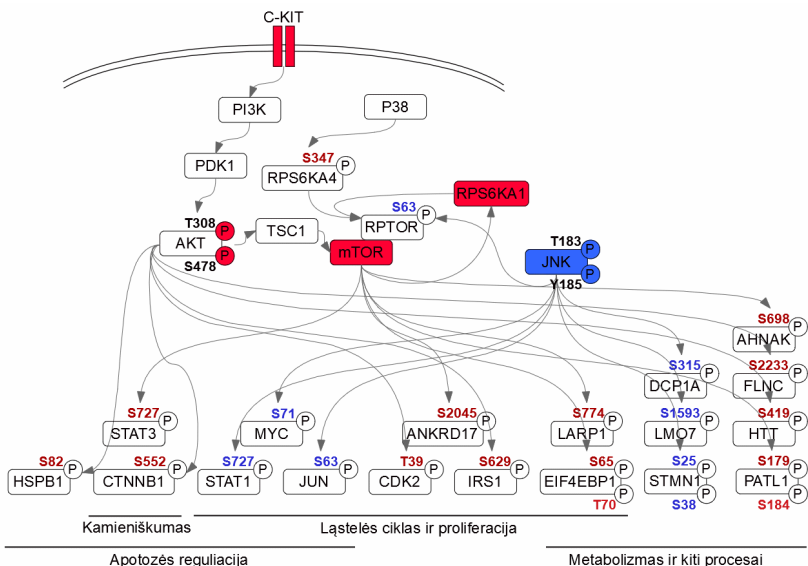
2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

2.1. RH1 atsparių krūties vėžio ląstelių tyrimai

RH1 atsparios MDA-MB-231 ląstelės (žymimos MDA-R) buvo gautos selekcionuojant tėvines MDA-MB-231 ląsteles (žymimos MDA-P) veikiant ląsteles RH1 preparatu didėjančiomis koncentracijomis 15 ciklų. Gautos ląstelės pasižymėjo 14 kartų didesniu atsparumu RH1 vaistui bei buvo atsparesnės RH1 sukeliamai ląstelių žūčiai.

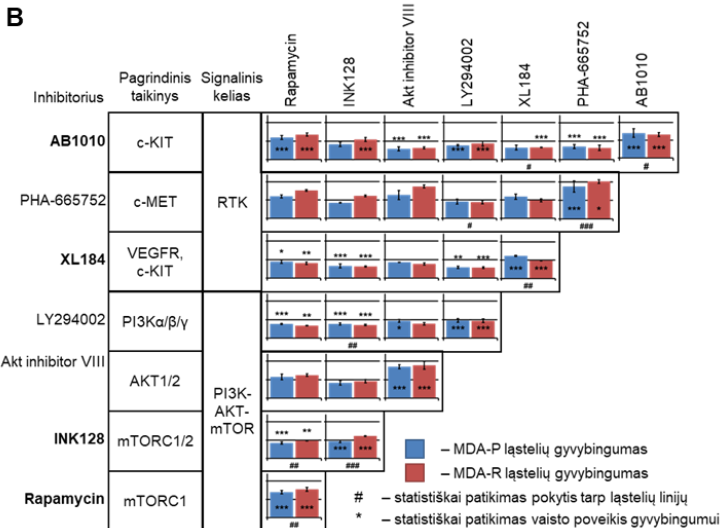
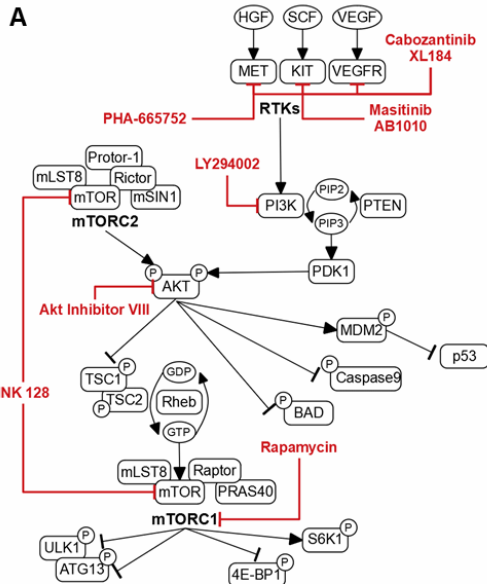
ANKSTESNI RH1 atsparių ląstelių tyrimai atlikti mūsų laboratorijoje parodė, kad MDA-MB-231 ląstelės nepasižymi dviejų pagrindinių RH1 aktyvuojančių fermentų NQO1 ir NQO2 aktyvumu, todėl RH1 veikia kitu mechanizmu nei įprasta. RH1 preparatas sukurtas remiantis teorija, kad vėžinės ląstelės turi aukštesnį oksidacinį-redukcinį potencialą ir dėl to aktyviau metabolizuoja RH1 paversdamos jį į aktyvią formą, gebančią sukelti DNR pažeidimus. Kadangi mūsų tiriamose ląstelėse oksidacinis-redukcinis potencialas nėra labiau išreikštas, manome, kad RH1 citotoksinis poveikis pasireiškia dėl kitų mechanizmų bei ląstelių atsparumas yra nulemtas su oksidaciniu-redukciniu potencialu nesusijusių biologinių procesų. Ši hipotezė patikrinta atliekant diferencinius aktyvių kinazių ir baltymų fosforilavimo tyrimus.

Atlikus tėvinių ir atsparių ląstelių diferencinės aktyvių kinazių bei baltymų fosforilavimo duomenų jungtinę analizę, parodėme, kad atspariose ląstelėse yra stipriau aktyvuojamas c-KIT-AKT-mTOR signalinis kelias (**1 pav.**).



1 pav. Labiausiai išreikšti signaliniai keliai pagal jungtinę tėvinių ir atsparių ląstelių diferencinę aktyviųjų kinazių bei baltymų fosforilavimo duomenų analizę. Raudonai pažymėti baltymai, kurių kiekis padidėjęs pagal aktyviųjų kinazių tyrimo duomenis, mėlynai – sumažėjęs. Raudonai pažymėtų baltymų fosforilavimo vietų kiekis yra padidėjęs, mėlynai – sumažėjęs. AKT ir JNK fosforilavimo vietas patvirtintos imunobloto metodu. Nenuspalvinti baltymai neidentifikuoti arba nepakitę.

C-KIT-AKT-mTOR signalinio kelio aktyvacijos svarba atsparių ląstelių gyvybingumui buvo patvirtinta atlikus kombinatorinę inhibitorinę analizę. Šios analizės rezultatai parodė, kad vienu metu slopinant c-KIT receptoriaus aktyvaciją bei AKT-mTOR signalinio kelio šaką stebimas didesnis ląstelių išijautrinimas ir gyvybingumo sumažėjimas nei naudojant kiekvieną iš inhibitorių atskirai (**2 pav.**). Palyginimui, tokio pat efekto nematome naudodami kitos receptorinės tirozino kinazės c-MET inhibitorių, nors šios kinazės padidėjusį aktyvumą taip pat rodo aktyviųjų kinazių proteominio tyrimo duomenys.

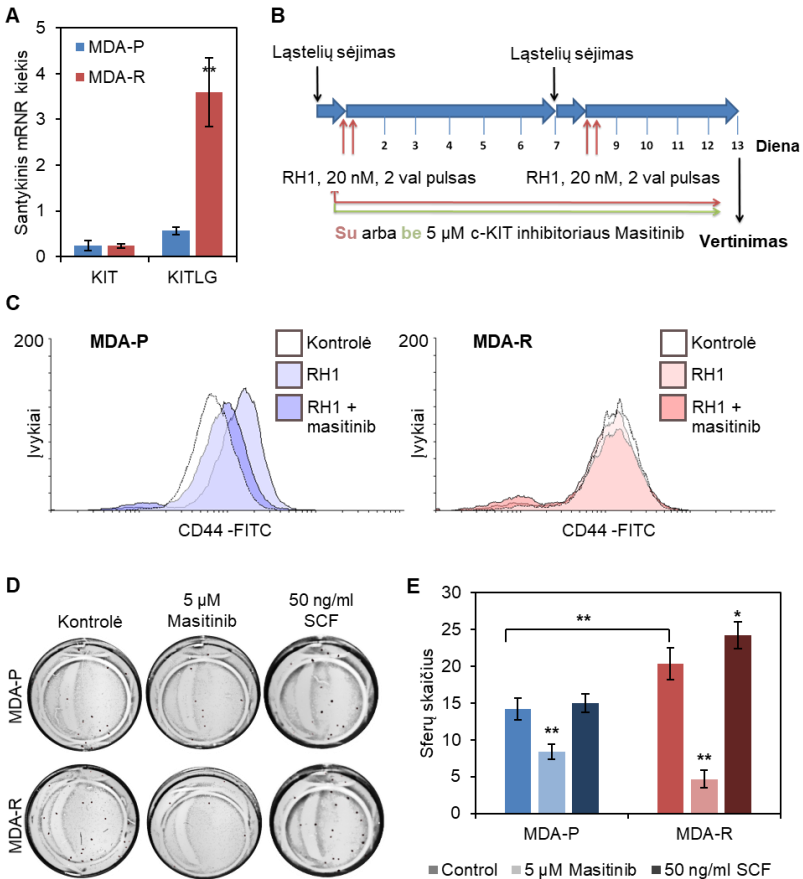


2 pav. Kombinatorinė inhibitorinė c-KIT-AKT-mTOR signalinio kelio analizė patvirtino šio kelio aktyvacijos svarbą gyvybingumui. **A.** C-KIT-AKT-mTOR signalinio kelio schema. Raudonai pažymėti inhibitoriai naudoti kombinatorinei inhibitorinei analizei. **B.** Ląstelių gyvybingumas po kombinuoto 48 valandų

poveikio inhibitoriais. Ląstelių gyvybingumas įvertintas MTT testu 96 valandos po poveikio pradžios. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis tarp ląstelių linijų: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, statistiškai patikimas vaisto poveikis gyvybingumui: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA Post-Hoc sąveikų analizė, $n = 3$.

Kadangi c-KIT receptoriaus yra siejamas su ląstelių kamieniškumu, kuris dažnai lemia ląstelių atsparumą chemoterapiniams preparatams [8], nusprendėme patikrinti kamieninems ląstelėms būdingų žymenų raišką tėvinėse ir atspariose ląstelėse. Gauti rezultatai parodė, kad atsparios ląstelės pasižymi CD44+/CD24- fenotipu, kuris krūties vėžio atveju dažnai siejamas su navikinių ląstelių agresyvumu ir naujo naviko iniciavimo potencialu [9]. CD44 žymuo buvo pasirinktas kamieniškumu pasižyminčios populiacijos identifikavimui tolimesniems tyrimams.

Kamieninių ląstelių augimo veiksnys SCF, vienintelis c-KIT receptoriaus ligandas, dalyvauja kamieninių ląstelių gyvybingumo, augimo palaikymo ir reguliavimo procesuose [10]. C-KIT receptoriaus ir ligando raiškos lygis nustatytas realaus laiko kiekybiniu PGR parodė, kad c-KIT receptoriaus raiškos lygis yra nepakitęs atspariose ląstelėse, tačiau ligando raiškos lygis yra pakilęs daugiau nei 3 kartus (**3 pav. A**). Šie duomenys kartu su aktyvių kinazių globalios analizės duomenimis rodo galimą autokrinę c-KIT receptoriaus stimuliaciją.

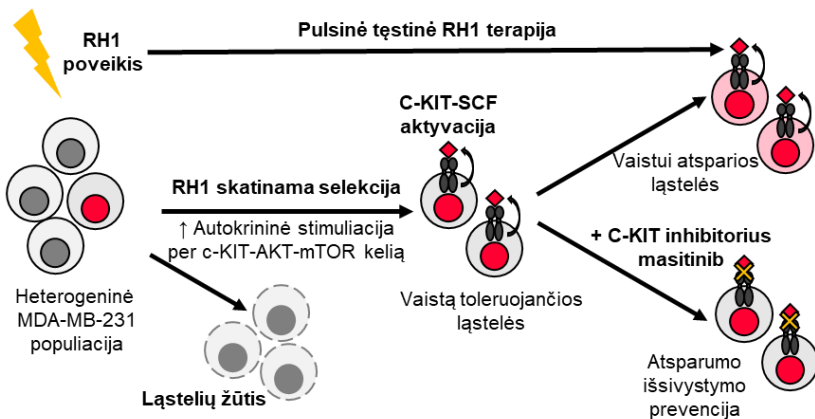


3 pav. C-KIT receptoriaus slopinimas stabdo kamieniškumo atsiradimą tėvinių ląstelių populiacijoje ir sumažina atsparių ląstelių potencialą inicijuoti naviko formavimąsi. **A.** C-KIT receptoriaus ir jo ligando raiškos lygio nustatymas. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **B.** Trumpalaikės selekcijos schema. **C.** CD44 pozityvių ląstelių populiacijos nustatymas tėkmės citometrijos būdu po trumpalaikės selekcijos. **D.** Naviko iniciavimo iš pavienių ląstelių tyrimas naudojant sferų formavimo metodą. **E.** Sferų formavimo eksperimento duomenų vertinimas. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$.

Siekiant išsiaiškinti c-KIT receptoriaus aktyvacijos svarbą atsparumo išsivystymo procese, atlikome trumpalaikės selekcijos

eksperimentą, kurio metu ląstelės buvo veikiamos 2 valandų RH1 pulsais ir paliekamos atsigauti, ciklas kartotas 2 kartus, selekcija truko 13 dienų (**3 pav. B**). Ta pati selekcijos schema taikyta poveikį vaistų kombinuojant su c-KIT receptoriaus inhibicija. Gauti rezultatai parodė, kad slopinant c-KIT receptoriaus aktyvaciją slopinamas CD44 pozityvių ląstelių atsiradimas tėvinėje ląstelių linijoje (**3 pav. C**). Kadangi tos pačios tendencijos nematėme atsparių ląstelių atveju, nusprendėme įvertinti, kokią įtaką ląstelių kamieninėms savybėms palaikyti turi c-KIT receptoriaus aktyvacija. Šiam tikslui atliktas sferų formavimo eksperimentas apribojantis ląstelių tarpusavio sąveikas bei sąveikas su substratu bei parodantis pavienių ląstelių galimybes suformuoti naviką, kas yra vienas pagrindinių vėžinių kamieninių ląstelių požymių. Gauti rezultatai parodė, kad tokiomis sąlygomis atsparios ląstelės geba suformuoti daugiau sferų iš pavienių ląstelių (**3 pav. D ir E**). Taip pat atsparios ląstelės yra žymiai jautresnės c-KIT receptoriaus slopinimui ir esant terpėje c-KIT inhibitoriaus beveik visiškai praranda potencialą formuoti kolonijas. Papildoma ląstelių stimuliacija c-KIT ligandu SCF padidina atsparių, bet ne RH1 jautrių ląstelių gebėjimą formuoti sferas, kas rodo kompleksinę kamieniškumo reguliaciją per c-KIT-AKT-mTOR signalinį kelią.

Apibendrinus gautus rezultatus, jungtinės aktyvių kinazių ir baltymų fosforilavimo analizės metu išryškinti signaliniai keliai yra svarbūs atsparumo vystymosi procesuose. Ypatingai svarbi c-KIT-AKT-mTOR signalinės atšakos aktyvacija, kuri lemia kamieniškumo požymių turinčių ląstelių selekciją, pasižyminčių didesne tolerancija vaistui. RH1 preparato kombinacija su ląstelių kamieniškumą lemiančių požymių slopinimu naudojant c-KIT signalinio kelio inhibitorių gali būti perspektyvi strategija efektyviai trigubai neigiamo krūties vėžio terapijai (**4 pav.**).

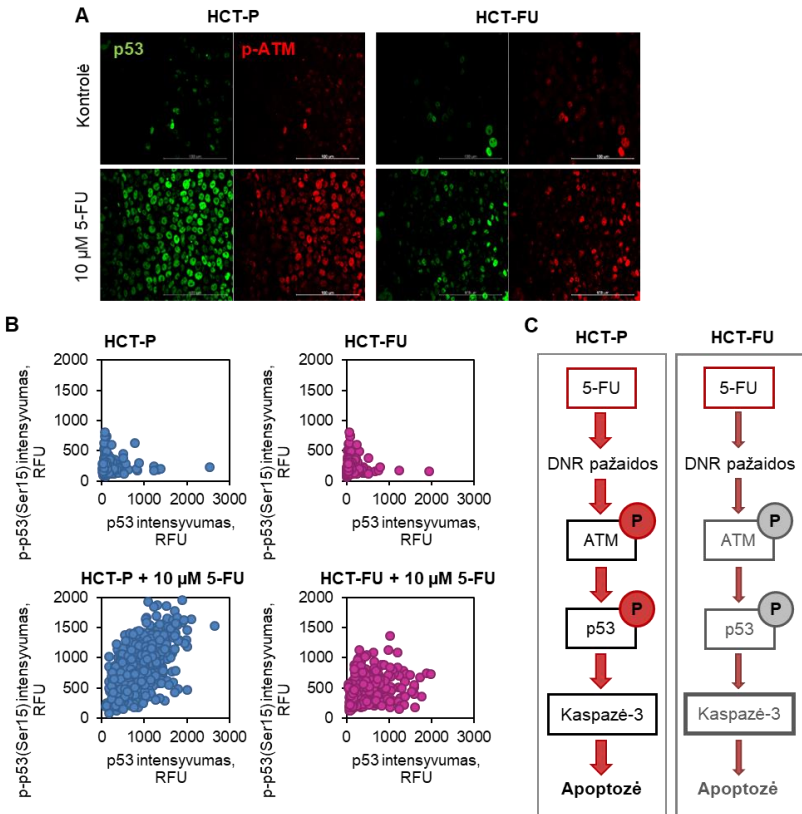


4 pav. Siūloma trigubai neigiamo krūties vėžio MDA-MB-231 ląstelių atsparumo RH1 preparatui išsivystymo schema.

2.2. 5-fluoruracilui atsparių kolorektalinio vėžio ląstelių tyrimai

5-fluoruracilui atsparios HCT116 ląstelės (žymimos HCT-FU) buvo gautos selekcionuojant tėvines HCT116 ląsteles (žymimos HCT-P) auginant ląsteles terpėje su vis didėjančiomis 5-fluoruracilo koncentracijomis. Gautos ląstelės pasižymėjo 7,5 karto didesniu atsparumu 5-fluoruracilo poveikiui. Taip pat atsparios ląstelės pasižymėjo silpnesne kaspazės-3 aktyvacija po vaisto poveikio bei kaspazės-3 slopinimas specifiniu inhibitoriumi reikšmingai sumažino ląstelių žūtį po vaisto poveikio, kas rodo konvencinį 5-fluoruracilo citotoksiškumo mechanizmą tiriamose ląstelėse.

Globali diferencinė proteominė 5-fluoruracilui atsparių ląstelių analizė parodė, kad šiose ląstelėse pakito nukleotidų metabolizmo procese dalyvaujantys baltymai. Kadangi 5-fluoruracilas yra antimetabolitas ir tam, kad atliktų savo citotoksinę funkciją ląstelėje turi būti paverčiamas į aktyvią formą fermentų, dalyvaujančių nukleotidų metabolizme [11], pakitęs šių fermentų aktyvumas gali lemti nepakankamą 5-fluoruracilo aktyvaciją.



5 pav. 5-fluoruracilui atsparios ląstelės patiria mažiau DNR pažaidų po 5-fluoruracilo poveikio. **A.** Konfokalinės mikroskopijos vaizdai reprezentuojantys p53 (žalias kanalas) ir fosforilinto ATM baltymo (raudonas kanalas) kiekius ląstelėje. Ląstelės veiktos arba neveiktos 10 μ M 5-fluoruracilo 24 valandas. **B.** p53 ir fosforilinto p53 baltymo kiekio analizė pavienėse ląstelėse iš konfokalinės mikroskopijos vaizdų. **C.** Siūloma HCT116 ląstelių atsparumo 5-fluoruracilui mechanizmo schema.

Siekdami patikrinti, ar 5-fluoruracilas yra metabolizuojamas iki aktyvių junginių bei sugeba sukelti DNR pažaidas ląstelėje, patikrinome kelių DNR pažaidų aktyvuojamų baltymų raišką ląstelėje. Rezultatai parodė, kad paveikus tėvines ląsteles vaistu padidėja vėžio supresorinio baltymo p53 kiekis ląstelėje bei DNR pažaidų jutiklio ATM baltymo fosforilinimas, rodantis įvykstančias

DNR pažaidas. 5-fluoruracilui atsparių ląstelių atveju buvo stebimas žymiai silpnesnis atsakas į vaisto poveikį (5 pav. A). Įvertinę p53 baltymo fosforilimą, kuris lemia baltymo stabilumo padidėjimą ir kaupimąsi ląstelėje, pastebėjome tokią pačią tendenciją (5 pav. B). P53 baltymo fosforilinimas tiesiogiai koreliavo su baltymo kiekiu, o kadangi šio baltymo fosforilimas yra tiesiogiai susijęs su jo transkripciniu aktyvumu [12], galime teigti, kad dėl nepakankamos p53 baltymo aktyvacijos nevyksta adekvatus atsakas į vaistą ir stebimas žymiai silpnesnis 5-fluoruracilo citotoksinis poveikis (5 pav. C).

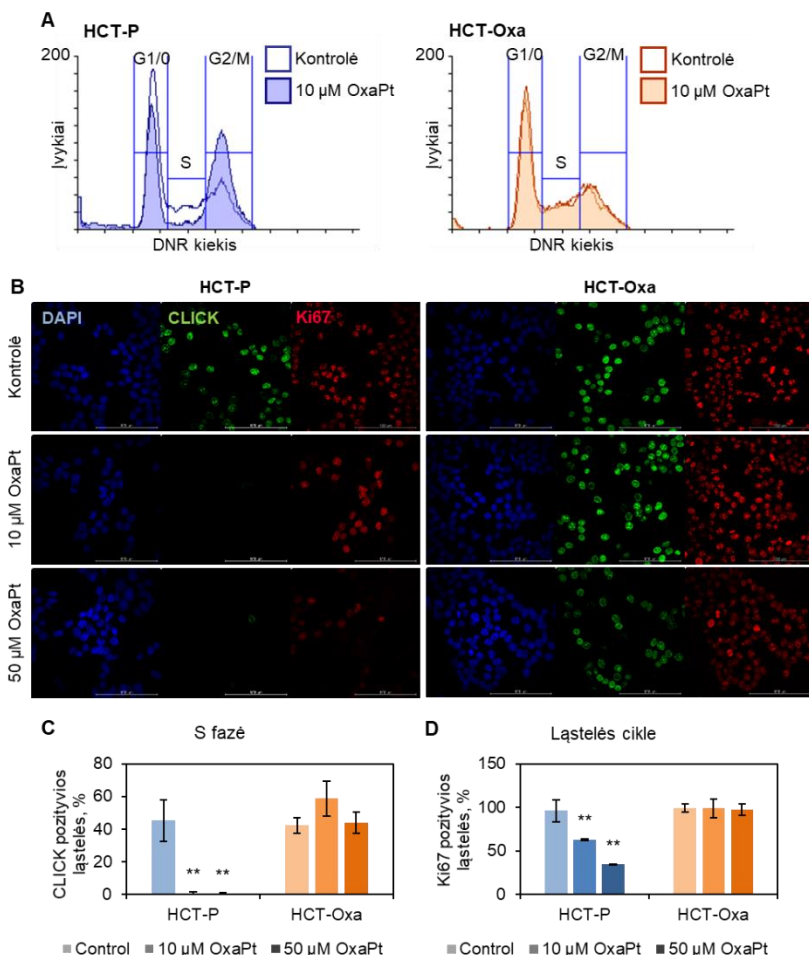
2.3. Oksaliplatinai atsparių kolorektalinio vėžio ląstelių tyrimai

Oksaliplatinai atsparios HCT116 ląstelės (žymimos HCT-Oxa) buvo gautos selekcionuojant tėvines HCT116 ląsteles (žymimos HCT-P) auginant ląsteles terpėje su vis didėjančiomis oksaliplatinos koncentracijomis. Gautos ląstelės pasižymėjo 15 kartų didesniu atsparumu oksaliplatinos poveikiui, o taip pat 4 kartus didesniu atsparumu 5-fluoruracilui, kitam adjuvantinės FOLFOX terapijos vaistui. Oksaliplatina nesukėlė atsparių ląstelių žūties naudojant vaisto koncentracijas letalias 50 % tėvinių ląstelių. Įdomu tai, kad tik labai nedidelė dalis žūstančių tėvinių ląstelių pasižymėjo kaspazės-3 aktyvacija. Toks rezultatas gali rodyti alternatyvių, nuo kaspazės-3 nepriklausomų ląstelės žūties mechanizmų aktyvaciją po oksaliplatinos poveikio.

Kadangi oksaliplatinai atsparių ląstelių žūtis nebuvo stebima po vaisto poveikio, nutarėme patikrinti ląstelės ciklo pokyčius. Tėkmės citometrijos rezultatai parodė, kad tėvinių ląstelių ženkliai sumažėja S ciklo fazėje ir padidėja G2/M ciklo stadijoje, tačiau oksaliplatinai atsparių ląstelių ciklo vaisto poveikis nekeičia (6 pav. A). Konfokalinės mikroskopijos rezultatai parodė, kad po oksaliplatinos poveikio beveik nelieta aktyvių DNR sintetinančių tėvinių ląstelių

bei sumažēja lāstelīu, kurios aktyviai juda lāstelēs ciklē (6 pav. B, C ir D). Abu šie pokyčiai nebūvo būdingi oksaliplatinai atsparioms lāstelēm.

Tokie radikalūs lāstelēs atsparumo pokyčiai dažnai rodo negrižtamus genetinius pokyčius atspariosē lāstelēs.



6 pav. Oksaliplatinai atsparios lāstelēs išvēngia sustojimo lāstelēs ciklē po vaisto poveikio. **A.** Lāstelēs ciklo nustatymas tēkmēs citometrijos būdu. Lāstelēs veiktos

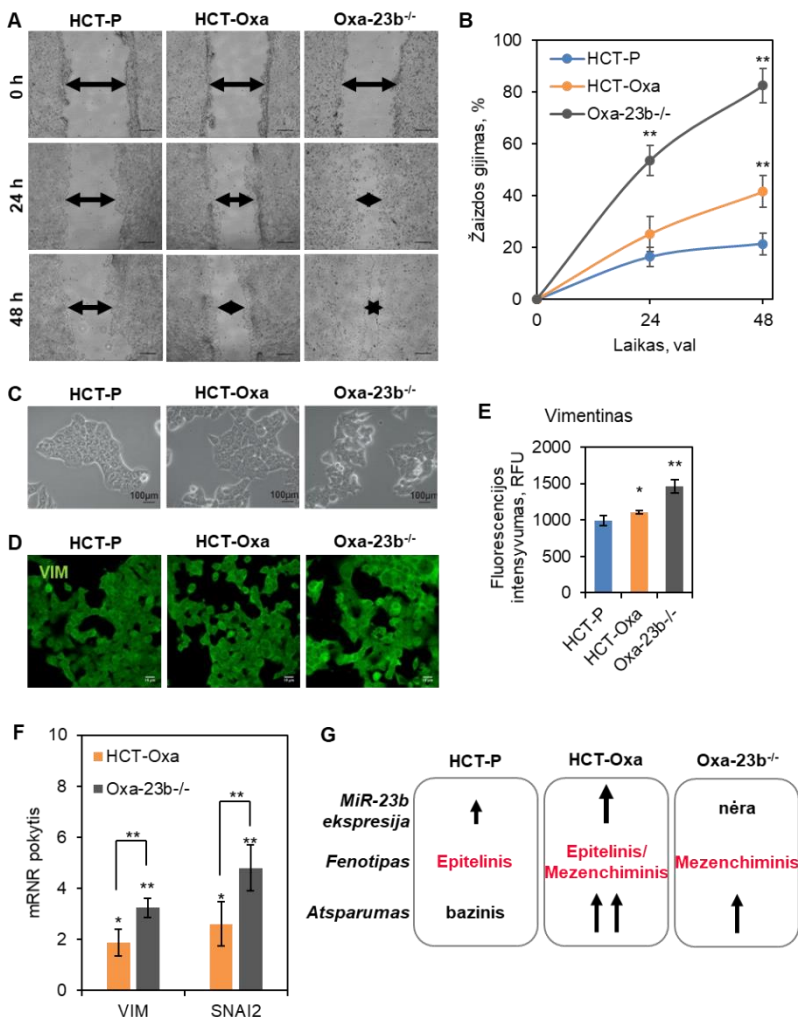
arba neveiktos 10 μ M oksaliplatinos 24 valandas. **B** Konfokalinės mikroskopijos vaizdai reprezentuojantys S fazėje esančias CLICK reagentu dažytas (žalias kanalas) ląstelės ir cikle judančias Ki67 baltymą ekspresuojančias (raudonas kanalas) ląsteles. Mėlynai nudažyti ląstelių branduoliai. Ląstelės veiktos arba neveiktos 10 ar 50 μ M oksaliplatinos 24 valandas. **C**. CLICK pozityvių ląstelių analizė iš konfokalinės mikroskopijos vaizdų. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **D**. Ki67 pozityvių ląstelių analizė iš konfokalinės mikroskopijos vaizdų. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$.

2.3.1. Epitelinio-mezenchiminio virsmo tyrimai oksaliplatinai atspariose ląstelėse

Siekiant nustatyti oksaliplatinai atsparių ląstelių atsparumo mechanizmus, buvo atlikta mažųjų RNR analizė, kuri parodė miR-23b/27b/24-1 klasterio raiškos padidėjimą. Kadangi miRNR gali valdyti įvairius procesus ląstelėje, nutarėme atlikti miR-23b ir miR-27b išveiklinimą oksaliplatinai atspariose ląstelėse ir nustatyti jų įtaką ląstelių atsparumui. Ląstelių gyvybingumo tyrimai po miRNR išveiklinimo parodė, kad tik miR-23b raiška turėjo reikšmingos įtakos atsparumui oksaliplatinai. Tolimesni proteominiai ląstelių neekspresuojančių miR-23b tyrimai parodė šios miRNR reikšmę su epiteliniu-mezenchiminiu virsmu susijusių procesų reguliavime. Siekiant validuoti proteomikos rezultatus atlikome ląstelių migracijos ir epitelinio-mezenchiminio virsmo žymenų analizės.

Pirma, įvertinome ląstelių migracijos potencialą panaudodami žaizdos gijimo testą. Šis testas parodė, kad ląstelės su išveiklinta miR-23b pasižymėjo didžiausiu migracijos potencialu, mezenchiminėms ląstelėms būdinga morfologija bei didžiausia mezenchiminių ląstelių žymenų raiška (7 pav.). Nepaisant labiausiai išreikšto mezenchiminio fenotipo miR-23b neekspresuojančios ląstelės pasižymėjo mažesniu atsparumu vaistui nei oksaliplatinai atsparios ląstelės. Kadangi oksaliplatinai atsparios ląstelės pasižymėjo didžiausiu atsparumu bei hibridiniu epiteliniu-mezenchiminiu fenotipu, padarėme išvadą, kad būtent toks fenotipas

užtikrina didžiausią ląstelių atsparumo išsivystymo tikimybę (7 pav. G).



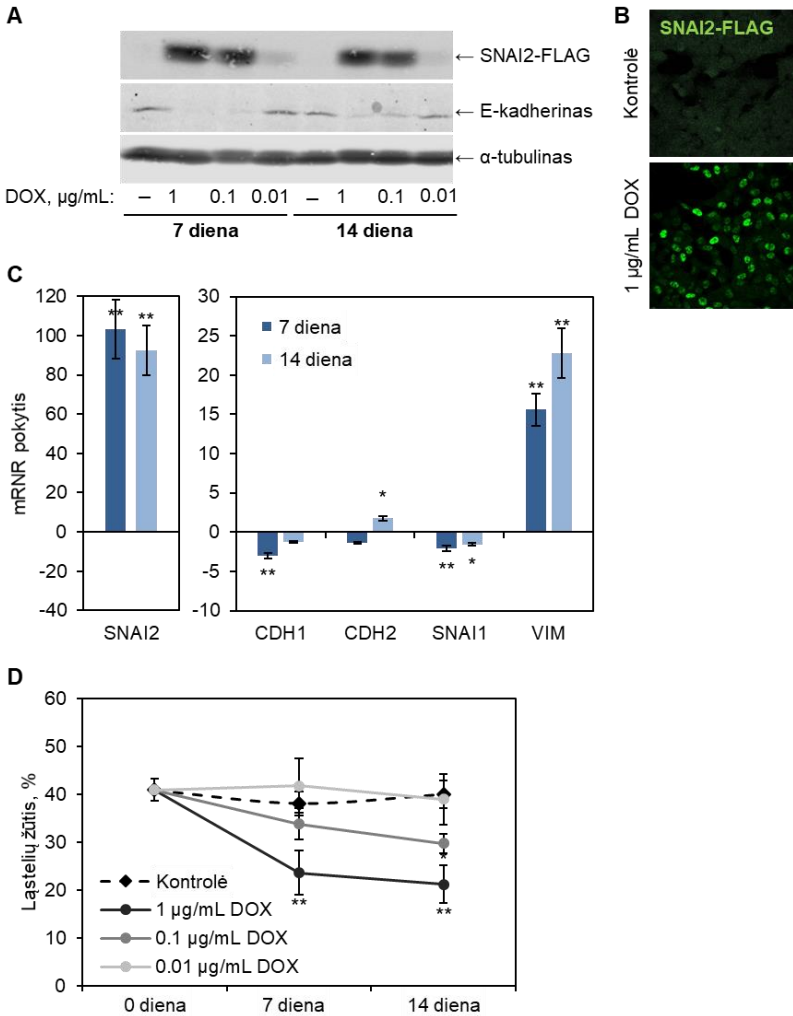
7 pav. MiR-23b dalyvauja epitelinio-mezenchiminio virsmo reguliacijos procesuose. **A.** Šviesinės mikroskopijos vaizdai iliustruojantys žaizdos gijimo intensyvumą. **B.** Ląstelių migracijos į žaizdos plotą įvertinimas iš šviesinės mikroskopijos vaizdų. Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **C.** Ląstelių

morfologijos skirtumai užfiksuoti šviesiniu mikroskopu. **D.** Konfokalinės mikroskopijos vaizdai reprezentuojantys vimentino kiekį ląstelėse (žalias kanalas). **E.** Vimentino kiekio įvertinimas iš konfokalinės mikroskopijos vaizdų. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **F.** Epitelinio-mezenchiminio virsmo žymenų raiškos vertinimas. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **G.** MiR-23 ekspresuojančių ir neekspresuojančių ląstelių fenotipo ir atsparumo apibendrinanti schema.

Kadangi ląstelių su išveiklinta miR-23b epitelinio-mezenchiminio fenotipo tyrimai parodė vieno iš ši procesą reguliuojančių transkripcijos veiksnių SNAI2 pokytį, nusprendėme patikrinti, kokią įtaką indukuojama SNAI2 ekspresija gali daryti ląstelių atsparumui. Šiam tikslui naudodami lentivirusinį indukuojamos raiškos vektorių indukavome SNAI2 baltymą tėvinėse ląstelėse. Indukuotas baltymas pasižymėjo aktyvumu, nes slopino savo tiesioginio taikinio E-kadherino raišką bei pasižymėjo transkripcijos veiksniams būdinga branduoline lokalizacija (**8 pav. A ir B**).

Ilgalaikė 7 ir 14 dienų indukcija parodė įvykstantį ląstelių perprogramavimą mezenchiškumo kryptimi dėl padidėjusios SNAI2 geno raiškos. SNAI2 transkripcijos represorius slopino CDH1 geno, koduojančio E-kadheriną, raišką ir skatino VIM geno, koduojančio vimentiną, raišką (**8 pav. C**). E-kadherino sumažėjimas bei vimentino padidėjimas siejami su ląstelių mezenchiminio fenotipo pasireiškimu, padidėjusia ląstelių migracija bei invazyvumu [13].

Padidėjusi SNAI2 raiška taip pat padidino ląstelių atsparumą oksaliplatinai, be to, ląstelių atsparumo padidėjimas tiesiogiai priklausė nuo ekspresuojamo baltymo kiekio, kuris buvo keičiamas naudojant skirtingas induktoriaus koncentracijas (**8 pav. D**). Įdomu tai, kad naujais duomenys rodo, kad SNAI2 transkripcijos veiksnys gali būti siejamas būtent su tarpinio epitelinio-mezenchiminio fenotipo palaikymu [14]. Taip pat parodyta, kad tarpinio epitelinio-mezenchiminio fenotipo ląstelės dažnai pasižymi vėžio kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis, tokiomis kaip padidėjęs ląstelių plastiškumas bei naviko iniciavimo potencialas [15].



8 pav. SNAI2 transkripcijos veiksnys skatina mezenchiminio ląstelių fenotipo pasireiškimą bei atsparumo išsivystymą. **A.** SNAI2 baltymo ir jo taikinio E-kadherino kiekio analizė po SNAI2 indukcijos skirtingomis induktoriaus koncentracijomis. α -tubulinas naudotas kaip pavyzdžio kiekio kontrolė. **B.** Konfokalinės mikroskopijos vaizdai reprezentuojantys SNAI2 transkripcijos veiksnio pasiskirstymą ląstelėse (žalias kanalas). **C.** Epitelinio-mezenchiminio virsmo žymenų raiškos pokyčių po SNAI2 indukcijos vertinimas. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

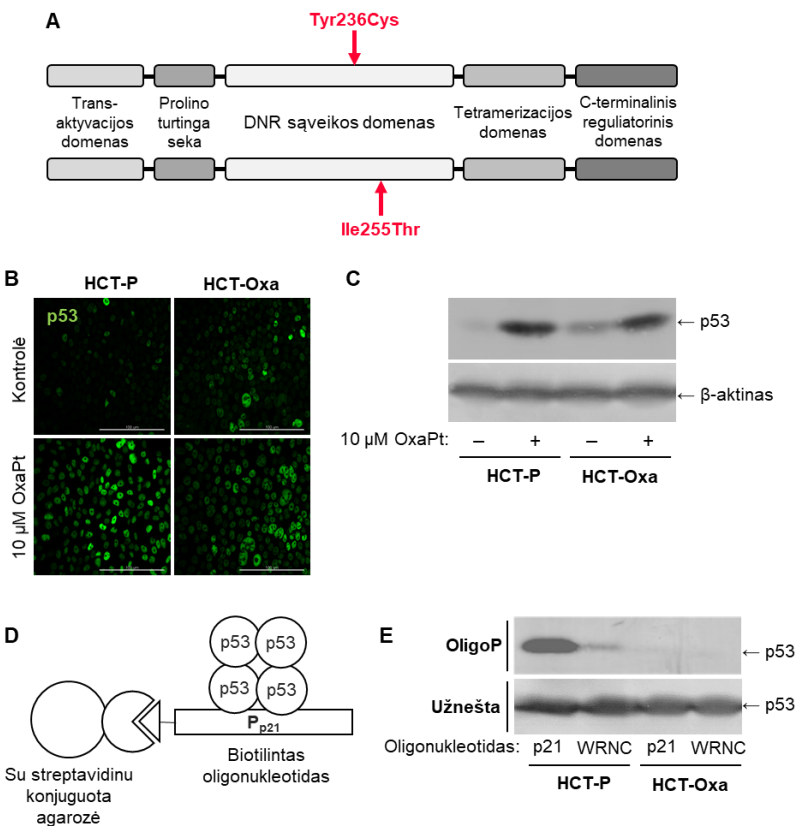
0.05, ** p < 0.01, ANOVA, n = 3. **D.** Ląstelių atsparumo oksaliplatinai po SNAI2 indukcijos vertinimas. Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * p < 0.05, ** p < 0.01, ANOVA, n = 3.

2.3.2. Vėžio supresorinio baltymo p53 reikšmės atsparumui oksaliplatinai vertinimas

Oksaliplatinai atsparių ląstelių diferencinė proteominė analizė parodė vėžio supresorinio baltymo p53 bei su juo transkripciškai susijusių baltymų kiekio pakitimą atspariose ląstelėse. Įdomu tai, kad paties p53 baltymo kiekis buvo padidėjęs, kas nebūdinga atsparumo vystymosi procesui nebent yra nustatoma šio baltymo mutacija. Kadangi ankstesni tėvinių ir atsparių ląstelių atsako į vaistą tyrimų rezultatai parodė drastišką atsparumo skirtumą, kuris galėjo atsirasti dėl atspariose ląstelėse įvykusių negrįžtamų genetinių pokyčių, nutarėme atlikti p53 baltymo sekvenavimą.

Sekvenavimo rezultatai parodė, kad p53 baltymas yra mutuoatas 236 ir 255 pozicijose, kurios abi yra sąveikos su DNR domene (**9** pav. A). P53 baltymo mutacijos yra labai dažnos vėžinių susirgimų atveju ir gali lemti greitą baltymo suskaldymą dėl nestabilios struktūros arba paveikti baltymo sąveikos su DNR stiprumą [16]. Norėdami patikrinti p53 baltymo stabilumą tėvinėse ir atspariose oksaliplatinai ląstelėse, vizualizavome baltymą ląstelėje imunofluorescentinės ir imunobloto analizės būdais po poveikio vaistu. Gauti rezultatai parodė aukštesnį bazinį baltymo kiekį atspariose ląstelėse, kas patvirtino globalios proteomikos rezultatus (**9** pav. B ir C). Taip pat pamatėme baltymo kiekio padidėjimą abiejose ląstelių linijose po oksaliplatinos poveikio.

Kadangi šie rezultatai parodė, kad p53 pasižymi normaliu stabilumu atspariose ląstelėse, nusprendėme patikrinti, ar mutuoatas p53 išlaikė galimybę sąveikauti su DNR. Šiam tikslui atlikome oligoprecipitacijos eksperimentą, kuris parodė, kad mutuoatas p53 baltymas oksaliplatinai atspariose ląstelėse nesąveikauja su savo pagrindinio taikinio p21 baltymo promotoriaus seka (**9** pav. D ir E).



9 pav. Mutuotas p53 baltymas atspariose ląstelėse nesąveikauja su taikinio DNR sekomis. **A.** p53 baltymo domeninė struktūra. Identifikuotos mutacijos pažymėtos raudonai. **B.** Konfokalinės mikroskopijos vaizdai reprezentuojantys p53 baltymo kiekio padidėjimą po vaisto poveikio (žalias kanalas). **C.** Imunobloto analizė reprezentuojanti p53 baltymo kiekio padidėjimą po vaisto poveikio. **D.** Oligoprecipitacijos eksperimento schema. **E.** Oligoprecipitacijos rezultatų analizė imunobloto metodu. P21 promotoriaus seka naudota kaip teigiama kontrolė, WRNC oligonukleotidas – neigiama kontrolė.

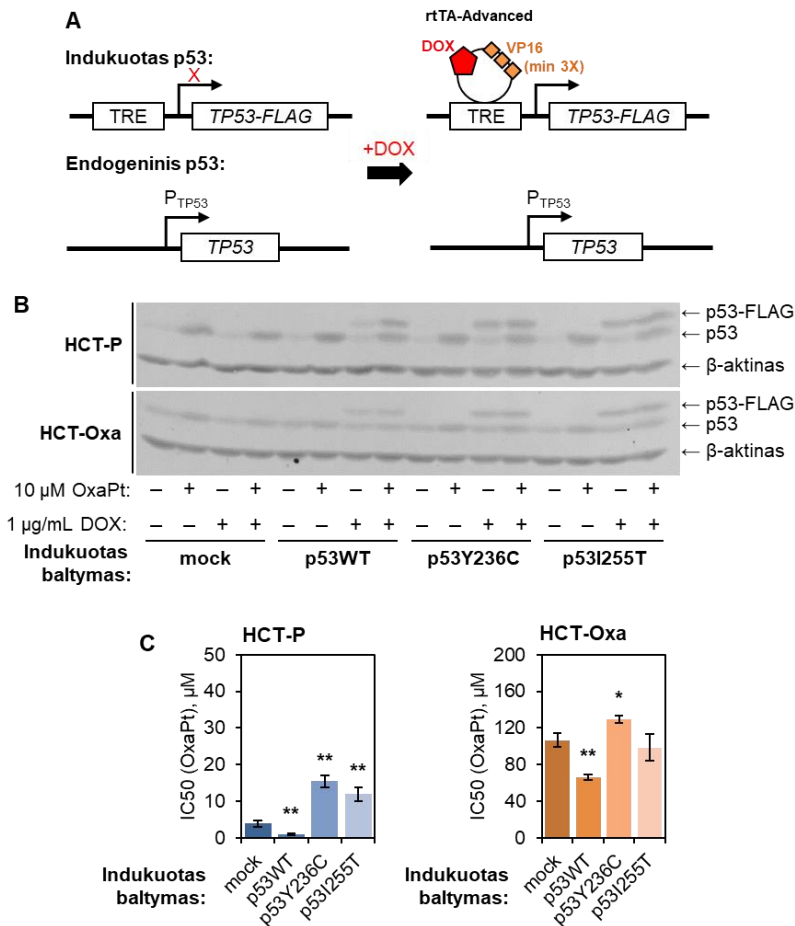
Žinomi atvejai, kai mutuotas p53 baltymas ląstelėse įgauna kitų funkcijų arba pasikeičia jo sąveikos su skirtingais promotoriais afiniškumas [17], todėl nusprendėme patikrinti, ar mutuotas p53 baltymas transkripciškai aktyvuoja kitus savo taikinius. Gauti rezultatai parodė, kad oksaliplatinai atspariose ląstelėse nėra

aktyvuojamas nė vienas iš tirtų p53 baltymo taikinių, o p21 baltymo raiškos nebuvimas patvirtintas ir mikroskopiniais metodais.

P53 baltymo aktyvumas dažnai yra siejamas su ląstelių atsparumu genotoksinį šoką sukeliantiems vaistams, nes yra vienas pagrindinių DNR pažaidų jutiklių [18]. P53 baltymo reikšmę ląstelių atsparumui nuspręsta iširti naudojant įvairias technologijas, leidžiančias manipuliuoti baltymo kiekiu. Visų pirma RNR interferencijos strategija buvo pasirinkta siekiant sumažinti p53 baltymo kiekį ląstelėje. Paaikškėjo, kad tėvinių ląstelių atsparumas tiesiogiai koreliuoja su p53 baltymo kiekiu, o atsparių ląstelių jautrumui vaistui p53 baltymo kiekio pokyčiai įtakos neturi, kas parodo, kad mutuotas p53 baltymas jokių su atsparumo palaikymu susijusių funkcijų neįgijo.

Toliau nusprendėme indukuoti laukinio tipo bei mutuoto p53 baltymo raišką tėvinėse ir atspariose ląstelėse naudodami lentivirusinį doksiciklinu indukuojamos raiškos vektorių (**10** pav. A). Indukavus p53 baltymo raišką ląstelėje yra sintetinamas tiek endogeninis, tiek indukuotas p53 baltymas, kurį galime atskirti dėl pažymėjimo FLAG epitopu ir šiek tiek padidėjusios molekulinės masės. Gauti rezultatai parodė, kad indukuotas laukinio tipo p53 ląstelėse veikia analogiškai kaip ir endogeninis baltymas – jo bazinis raiškos lygis nėra aukštas ir ženkliai padidėja po vaisto poveikio. Indukuojamo mutuoto p53 baltymo bazinis raiškos lygis yra aukštesnis ir beveik nekinta po vaisto poveikio (**10** pav. B).

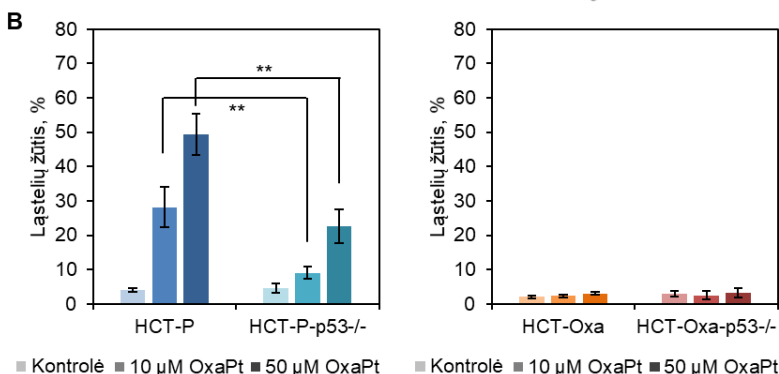
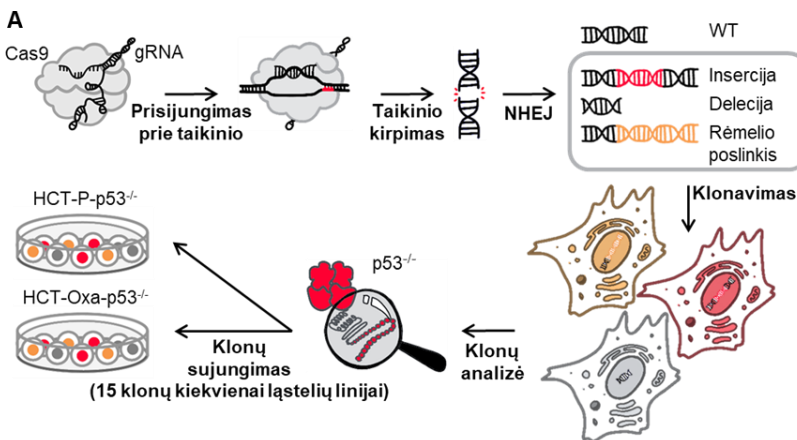
Taip pat indukcijos eksperimentai parodė, kad papildoma mutantinio indukuojamo baltymo raiška tėvinėse ląstelėse padidina ląstelių atsparumą oksaliplatinai (**10** pav. C). Indukavus laukinio tipo p53 baltymą oksaliplatinai atspariose ląstelėse atsparumas sumažėja, tačiau pokytis nėra labai dramatiškas dėl dominantinio neigiamo endogeninio mutuoto p53 baltymo efekto.



10 pav. Indukuojamas mutuoatas p53 baltymas padidina ląstelių atsparumą oksaliplatinai, o laukinio tipo p53 indukcija lemia ląstelių išsijautrinimą vaistui. **A.** Doksiciklinu indukuojamos ekspresijos sistemos schema. **B.** Endogeninio ir indukuoto p53 baltymo imunobloto analizė po poveikio induktoriaus ir vaistu. **C.** Ląstelių, ekspresuojančių indukuotą p53 baltymą, gyvybingumo analizė. Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis, statistškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$.

Kadangi visi gauti rezultatai rodė p53 baltymo aktyvacijos svarbą ląstelių atsakai į oksaliplatinos poveikį, nusprendėme išveiklinti p53 baltymą ir pabandyti nustatyti oksaliplatinos veikimo mechanizmą.

P53 baltymo išveiklinimui naudojome CRISPR/Cas9 sistemą, kuri turėjo sukelti insercijas, delecijas ar rėmelio poslinkio mutacijas *TP53* gene. Po poveikio Cas9 baltymu su į p53 baltymo geną nukreipta gidinės RNR seka, ląsteles išklonavome, atrinkome p53 neigiamus klonus ir juos sujungėme siekdami išvengti išklonavimo ir netikslinių mutacijų nulemtų atsparumo pokyčių (**11 pav. A**).



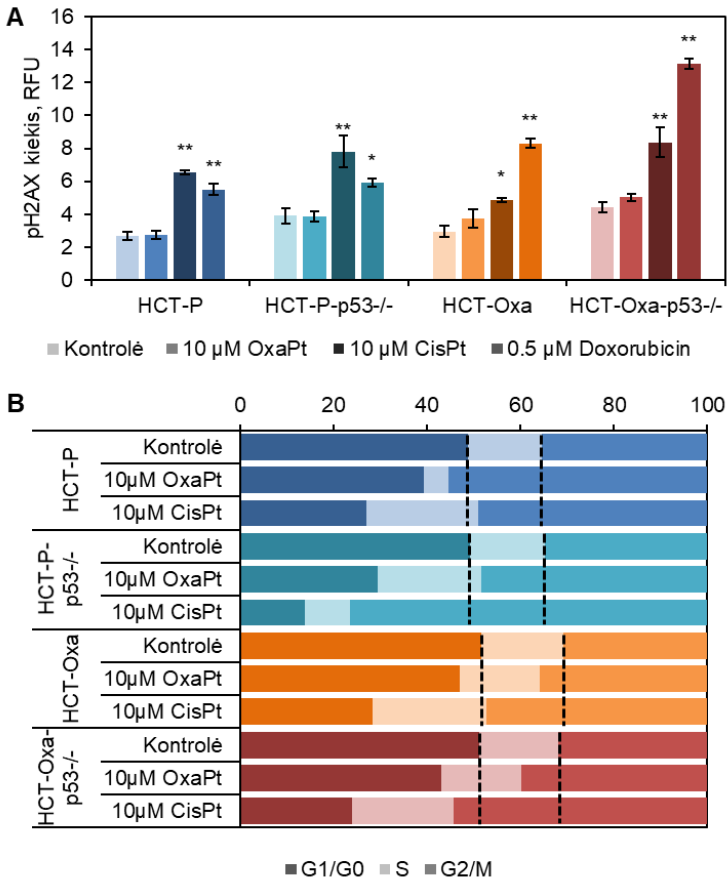
11 pav. P53 baltymo išveiklinimas pasinaudojant CRISPR/Cas9 sistema sukelia tėvinių ląstelių atsparumo padidėjimą. **A.** P53 baltymo išveiklinimo schema panaudojant CRISPR/Cas9 sistemą. **B.** P53 išveiklintų ląstelių žūtis po oksaliplatinos poveikio analizė. Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$.

Įvertinę p53 išveiklintų ląstelių atsparumą, nustatėme, kad tėvinės ląstelės su išveiklintu p53 įgavo atsparumą oksaliplatinai (**11** pav. B). Atsparios ląstelės nerodė jokių gyvybingumo pokyčių išveiklinus p53 baltymą, todėl padarėme išvadą, kad mutuotas p53 baltymas neįgijo jokių naujų su atsparumo palaikymu susijusių funkcijų.

P53 baltymo išveiklinimas leido detaliau panagrinėti oksaliplatinos veikimo mechanizmą. Visų pirma, nusprendėme patikrinti, kokio masto DNR pažaidas patiria ląstelės po oksaliplatinos, kito platinos preparato cisplatinos ir į DNR interkalijuojančio agento doksorubicino poveikio metu. Šiam tikslui konfokalinės mikroskopijos būdu nustatėme vieno pagrindinių DNR pažaidų atsako baltymų histono H2AX fosforilinimą. Šis histonas yra fosforilinamas į skirtingo pobūdžio DNR pažaidas reaguojančių kinazių, todėl yra tinkamas nustatyti bendrą DNR pažaidų lygį [19].

Gauti rezultatai parodė, kad tiek cisplatina, tiek doksorubicinas sukelia pažaidas tiek tėvinėse, tiek atspariose ląstelėse nepaisant skirtingo p53 baltymo statuso (**12** pav. A). Tačiau oksaliplatiną ląstelėje DNR pažaidų nesukelia ar bent jau neaktyvuoja konvencinių atsako į DNR pažaidas kelių.

Siekiant palyginti dviejų platinos junginių, oksaliplatinos ir cisplatinos, skirtingai veikiančių į DNR pažaidas įtaką ląstelių ciklui, atlikome ciklo analizę. Analizės rezultatai parodė, kad cisplatina veikia į ląstelės ciklą stabdydama ląsteles G2/M ciklo fazėje ir nors stabdymas yra skirtingo masto, šis efektas nepriklauso nei nuo ląstelių atsparumo, nei nuo p53 statuso (**12** pav. B). Tačiau oksaliplatinos atveju tėvinėse ląstelėse, ekspresuojančiose laukinio tipo p53 baltymą, matėme visiškai kitokią tendenciją – staigų ląstelių S fazėje sumažėjimą. Šis efektas nebuvo būdingas tėvinėms ląstelėms su išveiklintu p53, kurios kaip ir cisplatinos atveju stoji G2/M ciklo fazėje. Šie rezultatai parodė, kad nekonvencinis oksaliplatinos veikimo mechanizmas būdingas būtent ląstelėms ekspresuojančioms laukinio tipo p53 baltymą.

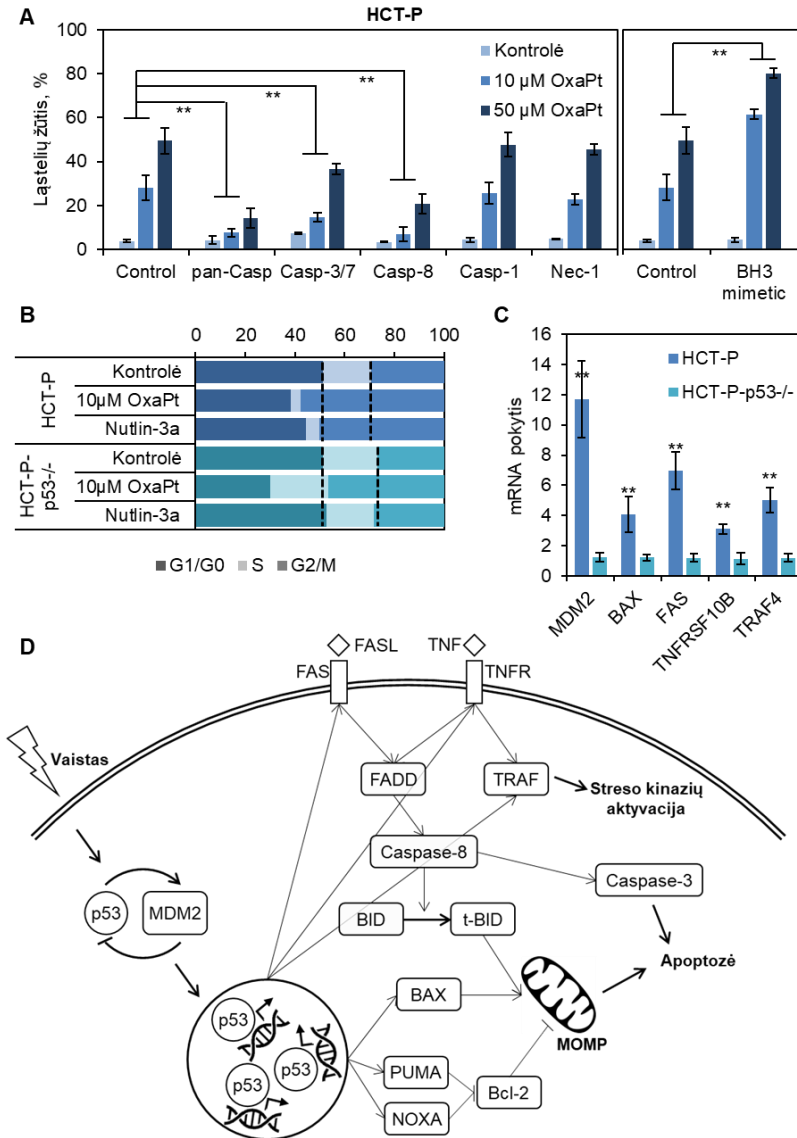


12 pav. Oksaliplatina nesukelia konvencinio atsako į DNR pažeidimus ir skirtingai nei cisplatina veikia į ląstelės ciklą laukinio tipo p53 baltymą ekspresuojančiose ląstelėse. **A.** Atsako į DNR pažeidimus vertinimas pagal fosforilinto histono H2AX kiekį iš konfokalinės mikroskopijos vaizdų. Duomenys pateikti kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis, statistiškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **B.** Ląstelių ciklo vertinimas tėkmės citometrijos būdu po vaistų poveikio.

Kadangi tėvinės laukinio tipo p53 baltymą ekspresuojančios ląstelės pasižymėjo skirtingu atsaku į oksaliplatinos poveikį, o ankstesni rezultatai rodė, kad tik dalis ląstelių žūsta nuo kaspazės-3 priklausomu būdu, nusprendėme patikrinti, kokių ląstelės žūties kelių

inhibicija išgelbėja ląsteles nuo citotoksinio oksaliplatinos poveikio. Šiam tikslui naudojome įvairių kinazių bei nekroptozės inhibitorius. Gauti rezultatai parodė, kad bendras visų kinazių slopinimas bei selektyvus kaspazės-8 slopinimas parodė geriausią efektą (**13** pav. A). Kaspazės-3 slopinimas nuo žūties apsaugojo tik apie pusę ląstelių, o uždegiminių kaspazių bei nekroptozės slopinimas nedavė jokio efekto. Kaspazė-8 dalyvauja išorinių signalų nulemtos apoptozės reguliacijoje ir sukelia mitochondrijų išorinės membranos permeabilizaciją bei kaspazės-3 aktyvaciją [20]. Kadangi mitochondrijų išorinės membranos permeabilizacija gali nulemti nuo kaspazių nepriklausomą ląstelių žūtį [21], nusprendėme patikrinti, ar BH3 mimetikai, skatinantys šį procesą, sensibilizuos ląsteles vaistui. Gauti rezultatai parodė, kad kombinuojant oksaliplatiną ir BH3 mimetiką galima pasiekti beveik 100 % siekiančią ląstelių žūtį naudojant žymiai mažesnes oksaliplatinos koncentracijas.

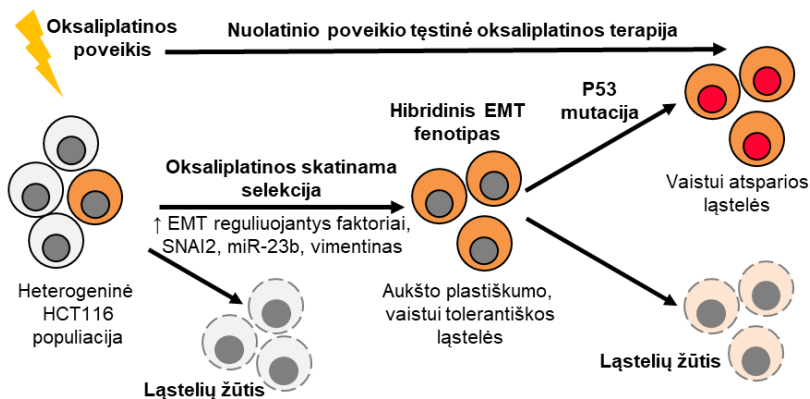
Toliau tyrėme, ar dirbtinis p53 baltymo kiekio padidinimas naudojant p53-MDM2 sąveikos inhibitorių sukelia panašų efektą į ląstelės ciklą kaip oksaliplatinos poveikis. Šie rezultatai patvirtino, kad ląstelių kiekio S fazėje sumažėjimui kritinę reikšmę turi būtent laukinio tipo p53 baltymas (**13** pav. B). Kadangi p53 baltymas gali aktyvuoti išorinių signalų nulemtos apoptozės reguliacinius baltymus, tokius kaip žūties receptoriai, nusprendėme patikrinti, ar sukiamas šių baltymų raiškos padidėjimas po oksaliplatinos poveikio. Gauti rezultatai parodė, kad šių baltymų raiška yra indukuojama vaisto poveikio laukinio tipo p53 baltymą ekspresuojančiose ląstelėse, tačiau nedetektuojama p53 išveiklintose ląstelėse (**13** pav. C). Tokie rezultatai leido mums daryti prielaidą, kad oksaliplatinos poveikis skatina p53 baltymo transkripcinį aktyvumą, dėl kurio padidėja ląstelės ciklą ir žūtį reguliuojančių baltymų raiška, ir pasireiškia vaisto citotoksinis poveikis (**13** pav. D).



13 pav. Oksaliplatinos citotoksinis poveikis pasireiškia dėl išorinių signalų nulemtos apoptozės skatinamos p53 baltymo transkripciškai aktyvuojamų baltymų. **A.** Ląstelių žūtis po oksaliplatinos ir skirtingų žūties kelių inhibitorių poveikio analizė. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistiškai

patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **B.** Ląstelių ciklo vertinimas tėkmės citometrijos būdu po p53-MDM2 sąveikos inhibitoriaus poveikio. **C.** P53 transkripcinių taikinių susijusių su ląstelės žūtimi raiškos vertinimas po oksaliplatinos poveikio. Duomenys pateikti kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis, statistškai patikimas pokytis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA, $n = 3$. **D.** P53 baltymo reikšmę apoptozės reguliacijoje atspindinti schema.

Apibendrinę visus su oksaliplatinos atsparumu susijusius rezultatus, parodėme, kad atsparumo oksaliplatinai išsivystymą gali lemti padidėjęs ląstelių plastiškumas dėl EMT reguliuojančių genų raiškos. Tolimesnis tokių vaistą toleruojančių ląstelių veikimas oksaliplatiną sukelia negrįžtamų genetinių pokyčių ląstelėje, kaip, pavyzdžiui, inaktyvuojanti vėžio supresoriaus p53 mutacija, kuri nulemia stipriai išreikštą ląstelių atsparumą oksaliplatinai (14 pav.). Ląstelių plastiškumo reikšmė ląstelių atsparumo išsivystymui yra pakankamai nauja tyrimų kryptis, pasižyminti perspektyva sukurti naujas efektyvaus, atsparumo išsivystymui kelia užkertančias vėžinių susirgimų gydymo strategijas [22].



14 pav. Siūloma kolorektalinės karcinomos HCT116 ląstelių atsparumo oksaliplatinai išsivystymo schema.

IŠVADOS

1. RH1 atsparių MDA-MB-231 ląstelių analizė rodo ląstelių ciklo reguliacijos, JNK signalinio kelio pokyčius ir c-KIT-AKT-mTOR kelio aktyvaciją kaip galimus atsparumo įgijimo mechanizmus.

2. Krūties vėžio ląstelių MDA-MB-231 selekcija RH1 preparatu lemia padidėjusia CD44 raiška pasižyminčių, kamieninių ląstelių požymių turinčių ląstelių populiacijos pagausėjimą, kurio galima išvengti ląsteles veikiant c-KIT receptoriaus inhibitoriumi.

3. 5-fluoruracilui atsparių kolorektalinės karcinomos HCT116 ląstelių analizė rodo nukleotidų metabolizmo pokyčius, lemiančius sukiamų DNR pažeidimų sumažėjimą.

4. Su epiteliniu-mezenchiminiu virsmu susiję miRNR miR-23b bei SNAI2 transkripcijos veiksnys palaiko tarpinį epitelinį-mezenchiminį fenotipą, padedantį atsparumo oksaliplatinai išsivystymui HCT116 ląstelėse.

5. Laukinio tipo p53 baltymo sukelta transkripcinių taikinių aktyvacija yra būtina citotoksiam oksaliplatinos efektui pasireikšti HCT116 ląstelių linijoje.

PUBLIKACIJOS IR PRANEŠIMAI KONFERENCIJOSE

Publikacijos:

Gasiulė, S.; **Dreize, N.**; Kaupinis, A.; Ražanskas, R.; Čiupas, L.; Stankevičius, V.; Kapustina, Ž.; Laurinavičius, A.; Valius, M.; Vilkaitis, G. Molecular Insights into miRNA-Driven Resistance to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin Chemotherapy: miR-23b Modulates the Epithelial-Mesenchymal Transition of Colorectal Cancer Cells. *J. Clin. Med.* 2019, 8, 2115. **Impact Factor: 5.58.**

Kuciauskas, D.; **Dreize, N.**; Ger, M.; Kaupinis, A.; Zemaitis, K.; Stankevicius, V.; Suziedelis, K.; Cicenas, J.; Graves, L.M.; Valius, M. Proteomic Analysis of Breast Cancer Resistance to the Anticancer Drug RH1 Reveals the Importance of Cancer Stem Cells. *Cancers* 2019, 11, 972. **Impact Factor: 6.16.**

Žodiniai pranešimai:

Dreize, N.; Kuciauskas, D.; Ger, M.; Kaupinis, A.; Zemaitis, K.; Stankevicius, V.; Suziedelis, K.; Cicenas, J.; Graves, L.M.; Valius, M. Proteomic Analysis of Breast Cancer Resistance to the Anticancer Drug RH1 Reveals the Importance of Cancer Stem Cells. 5th International Conference of Lithuanian Association of Stem Cells Researchers, 2019, Vilnius, Lithuania.

Stendiniai pranešimai:

Iesmantaitė, M.; **Dreize, N.**; Valius M. P53 Knockout by CRISPR-Cas9 System in HCT116 Cell Line Highlighted Importance of P53 Activation to Chemotherapy Drug Response. International Conference The COINS 2020, Vilnius, Lithuania.

Iesmantaitė, M.; **Dreize, N.**; Valius M. P53 Knockout in HCT116 Cell Line Revealed Clonal Heterogeneity. 4th International Life Sciences Conference “Vita Scientia”, 2020, Vilnius Lithuania.

Urnikytė, S.; **Dreizė, N.**; Valius M. EMT-inducing Transcription Factor SNAI2 Modulates Colorectal Cancer Cell Resistance to Oxaliplatin. 4th International Life Sciences Conference “Vita Scientia”, 2020, Vilnius Lithuania.

Dreize, N.; Kaupinis, A.; Ger, M.; Cicenias, J.; Laurinavicius, A.; Valius M. Proteomic Analysis of Colorectal Cancer Cell Resistance to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin Reveals New Mechanisms, Prognostics Markers, and Options for Novel Second Line Therapy. 2018 NCRI Cancer Conference, Glasgow, UK.

Dreize, N.; Kaupinis, A.; Ger, M.; Cicenias, J.; Laurinavicius, A.; Valius M. Proteomic Analysis of Colorectal Cancer Cell Resistance to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin Reveals New Mechanisms, Prognostics Markers, and Options for Novel Second Line Therapy. Life Sciences Baltics 2018, Vilnius, Lithuania.

Dreize, N.; Kuciauskas, D.; Ger, M.; Kaupinis, A.; Zemaitis, K.; Stankevicius, V.; Suziedelis, K.; Cicenias, J.; Graves, L.M.; Valius, M. Proteomic Analysis of Breast Cancer Resistance to the Anticancer Drug RH1 Reveals the Importance of Cancer Stem Cells. International Conference The COINS 2018, Vilnius, Lithuania.

Butkytė, S.; **Dreizė, N.**; Čiupas, L.; Maželis, I.; Kukcinavičiūtė, E.; Valius, M.; Vilkaitis, G. MiRNA-mediated Chemoresistance to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Colorectal Cells. EMBO/EMBL Symposium “Non-coding genome”, 2017, Germany.

Butkytė, S.; **Šumilova, N.**; Ger, M.; Ražanskas, R.; Čiupas, L.; Jonušienė, V.; Valius, M.; Vilkaitis, G. MiRNA-mediated Chemoresistance to 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in 3D Colorectal Cell Culture. EMBO/EMBL Symposium “Organoids, Modelling Organ Development and Disease in 3D Culture”, 2016, Germany.

NAUDOTA LITERATŪRA

- [1] S. J. Danson *et al.*, “Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the bioreductive drug RH1,” *Ann. Oncol.*, vol. 22, no. 7, pp. 1653–1660, Jul. 2011.
- [2] S. Sharif, M. J. O’Connell, G. Yothers, S. Lopa, and N. Wolmark, “FOLFOX and FLOX Regimens for the Adjuvant Treatment of Resected Stage II and III Colon Cancer,” *Cancer Invest.*, vol. 26, no. 9, pp. 956–963, Jan. 2008.
- [3] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method,” *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [4] J. R. Wiśniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, and M. Mann, “Universal sample preparation method for proteome analysis,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 359–362, May 2009.
- [5] P. Shannon, “Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks,” *Genome Res.*, vol. 13, no. 11, pp. 2498–2504, Nov. 2003.
- [6] G. Bindea *et al.*, “ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 8, pp. 1091–1093, Apr. 2009.
- [7] G. Bindea, J. Galon, and B. Mlecnik, “CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data,” *Bioinformatics*, vol. 29, no. 5, pp. 661–663, Mar. 2013.
- [8] A. Kreso and J. E. Dick, “Evolution of the Cancer Stem Cell Model,” *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 275–291, Mar. 2014.
- [9] M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison, and M. F. Clarke, “Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 100, no. 7, pp. 3983–3988, Apr. 2003.
- [10] B. Foster, D. Zaidi, T. Young, M. Mobley, and B. Kerr, “CD117/c-kit in Cancer Stem Cell-Mediated Progression and

- Therapeutic Resistance,” *Biomedicines*, vol. 6, no. 1, p. 31, Mar. 2018.
- [11] D. B. Longley, D. P. Harkin, and P. G. Johnston, “5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 330–338, May 2003.
- [12] J. Loughery, M. Cox, L. M. Smith, and D. W. Meek, “Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 12, pp. 7666–7680, Jul. 2014.
- [13] S. Lamouille, J. Xu, and R. Derynck, “Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 3, pp. 178–196, Mar. 2014.
- [14] V. Sundararajan, M. Tan, T. Z. Tan, J. Ye, J. P. Thiery, and R. Y.-J. Huang, “SNAIL recruits HDAC1 to suppress SNAIL2 transcription during epithelial to mesenchymal transition,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 8295, Dec. 2019.
- [15] T. Shibue and R. A. Weinberg, “EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 14, no. 10, pp. 611–629, Oct. 2017.
- [16] P. A. J. Muller and K. H. Vousden, “p53 mutations in cancer,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 2–8, Jan. 2013.
- [17] M. Oren and V. Rotter, “Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 2, Feb. 2010.
- [18] K. T. Bieging, S. S. Mello, and L. D. Attardi, “Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 5, pp. 359–370, May 2014.
- [19] M. Podhorecka, A. Skladanowski, and P. Bozko, “H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy,” *J. Nucleic Acids*, vol. 2010, pp. 1–9, 2010.
- [20] J.-Y. Yang, D. Michod, J. Walicki, and C. Widmann, “Surviving the kiss of death.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 68, no. 6, pp. 1027–31, Sep. 2004.
- [21] G. Kroemer and S. J. Martin, “Caspase-independent cell death,” *Nat. Med.*, vol. 11, no. 7, pp. 725–730, Jul. 2005.

- [22] S. Boumahdi and F. J. de Sauvage, “The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 19, no. 1, pp. 39–56, Jan. 2020.

TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĄ

Asmeninė informacija

Vardas, pavardė: Nadežda Dreižė
Adresas: Gyvybės mokslų centras, Saulėtekio al.7, LT10223
Vilnius, Lietuva
Telefonas(ai): +37052234415
El.paštas: nadezda.dreize@gmc.vu.lt
Gimimo data: 1990-04-14

Išsilavinimas

Data: 2013
Kvalifikacija: Biochemijos bakalauro laipsnis
Institucija: Vilniaus Universitetas

Data: 2015
Kvalifikacija: Biochemijos magistro laipsnis
Institucija: Vilniaus Universitetas

Data: 2015-2019
Kvalifikacija: Biochemijos doktorantūros studentė
Institucija: Vilniaus Universitetas

Darbo patirtis

Data: 2019 02-dabar
Pareigos: Mokslo darbuotoja
Darbovietė: UAB „NABELITA”

Data: 2019 10-dabar
Pareigos: Jaunesnioji mokslo darbuotoja
Darbovietė: Biochemijos institutas, Gyvybės mokslų centras

Projektinė veikla

2018-2021 „Pirminių ląstelių technologijų vystymas priešvėžinės chemoterapijos veiksmingumo didinimui“ (J05-LVPA-K-03-0080); Mokslo, inovacijų ir technologijų agentūra; vykdytoja.

2016-2018 „Naujo multifunkcinio nanobiosensoriaus sukūrimas ankstyvajai kasos vėžio diagnostikai“ (DiaKASA SEN-01/2016); Lietuvos mokslo taryba; vykdytoja.

2015-2018 „Nauji žymenys storosios žarnos vėžio individualizuotai terapijai: proteomika, mikroRNRomika, klinika“ (PROMa; SEN-17/2015), Lietuvos mokslo taryba; vykdytoja.

2014-2016 „Didelio pajėgumo proteomika naviko ląstelių paviršiaus baltymų atpažinimui kvantiniais taškais“ (SUREDOT; MIP-033/2014); Lietuvos mokslo taryba; vykdytoja.

UŽRAŠAMS

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