



VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

SAULĖ ZAGRECKAITĖ

NF- κ B reporterinių sistemų kūrimas ir jų efektyvumo tyrimas

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

Darbas atliktas NVI

Molekulinės onkologijos laboratorijoje

Darbo vadovai

Dr. Eglė Balčiūnaitė

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis

Vilnius, 2020 m.

TURINYS

SANTRUMPOS	3
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 NF-κB veiksniai, signalinis kelias ir jo reikšmė	7
1.1.1 NF-κB valdymas, kanoninis ir nekanoninis signalinis kelias	8
1.1.2 NF-κB ir imuninis atsakas	11
1.1.3 NF-κB ir vėžio vystymasis	12
1.1.4 Kitos NF-κB funkcijos	14
1.1.5 NF-κB slopikliai	15
1.2 p53 ir jo sąsaja su NF-κB veiksniais	15
1.3 NF-κB reporterinės sistemos	19
1.4 NF-κB ir CCL2	20
1.5 NF-κB ir LPS	21
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	23
2.1 Medžiagos	23
2.1.1 Medžiagos ląstelių auginimui ir jų tyrimui	23
2.1.2 Medžiagos bakterijų auginimui	23
2.1.3 Medžiagos DNR elektroforezei	24
2.1.4 Plazmidės	24
2.1.5 Bakterijų kamienai	24
2.1.6 Ląstelių kultūros	24
2.1.7 Kitos medžiagos	25
2.2 Metodai	25
2.2.1 Promotorių sekų analizė	25
2.2.2 DNR fragmentų su <i>CCL2</i> , <i>ELAM</i> promotoriais ir NF-κB sekomis paruošimas	25
2.2.3 Vektorių konstravimas	27
2.2.4 <i>E. coli</i> kompetentinių ląstelių paruošimas	29
2.2.5 Transformacija	29
2.2.6 Plazmidinės DNR gryninimas	29
2.2.7 Konstrukto patikrinimas restrikcine analize	30
2.2.8 DNR elektroforezė	30
2.2.9 Ląstelių auginimas	30
2.2.10 Ląstelių skaičiavimas	31
2.2.11 Ląstelių transfekcija ir fluorescencinė mikroskopija	31
2.2.12 Rezultatų analizė	31
2.2.13 Statistinė analizė	32
3. REZULTATAI	33
3.1 Sukonstruotos reporterinės sistemos ir jų struktūros analizė	33
3.2 Reporterinių sistemų efektyvumo analizė	35
3.3 Planuoti, bet dėl SARS-Cov-2 pandemijos neatlikti tyrimai	41
4. REZULTATŲ APTARIMAS	42
IŠVADOS	46
SANTRAUKA	47
SUMMARY	48
PADĖKA	49
LITERATŪROS ŠARAŠAS	50
PRIEDAI	55

SANTRUMPOS

A549 – žmogaus adenokarcinomos alveolių bazalinio epitelio ląstelių linija

CCL2 – CC chemokino ligando 2 genas (angl. *C-C Chemokine Ligand 2*)

CCL2 (MCP-1) – CC chemokino ligandas 2 (angl. *C-C Chemokine Ligand 2*) arba monocitus pritraukiantis baltymas 1 (angl. *Monocyte-Chemoattractant Protein-1*)

DAMPs – su pažaidomis susijusios molekulės, kurias išskiria šeimininko organizmas (angl. *Damage-Associated Molecular Patterns*)

ELAM – E-selektino genas, dar žinomas kaip endotelio-leukocitų adhezijos molekulės 1 genas (angl. *Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1*)

EMT – epitelinis-mezenchiminis ląstelės virsmas (angl. *Epithelial-Mesenchymal Transition*)

FACS – tekės citometrija (angl. *Fluorescence-activated cell sorting*)

FBS – veršelio embriono serumas (angl. *Fetal Bovine Serum*)

GFP (ŽFB) – žaliai fluorescuojantis baltymas (angl. *Green Fluorescent Protein*)

HCT 116 – žmogaus storosios žarnos karcinomos ląstelių linija

HEK293T – žmogaus embrioninių inkstų 293 ląstelių liniją, ekspresuojanti SV40 T antigeną

IκB – baltymų šeima, kuri slopina NF-κB veiksnius (angl. *NF-κB Inhibitor*)

IκBα (NFKBIA) – kinazė kappa B alfa, priklauso IκB kinazėms, inaktyvuoja NF-κB veiksnius (angl. *NF-κB Inhibitor alpha*)

IFN-γ – interferonas γ

IgE – imunoglobulinas E

IKK – kinazės I kappa B kompleksas, kuris inaktyvuoja NF-κB veiksnius

IL – interleukinas (angl. *Interleukin*)

YFP – geltonas fluorescuojantis baltymas (angl. *Yellow Fluorescent Protein*)

JS – jonizuojanti spinduliuotė

LPS – lipopolisacharidai (angl. *Lipopolysaccharides*)

MMPs – tarpląstelinio užpildo metaloproteinazės (angl. *Matrix Metalloproteinases*)

NF-κB – branduolio veiksnys κB (angl. *Nuclear Factor-κB*)

NK – natūralioji žudikė, imuninės sistemos ląstelė (angl. *Natural Killer*)

OD600 – optinis tankis, matuojamas ties 600 nm bangos ilgiu (angl. *Optical Density*)

p100 – NF-κB veiksnius inaktyvinantis baltymas

p53 (TP53) – naviką slopinančio geno baltymas 53

PAMPs – molekulės, kurios sukelia imuninį atsaką (angl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PRRs – patogenų molekules atpažįstantys receptoriai (angl. *Pattern-Recognition Receptors*)
RE – restrikcijos endonukleazė
ROS – reaktyvios deguonies formos (angl. *Reactive Oxygen Species*)
shDNR – trumpa plaukų segtuko struktūros DNR (angl. *short hairpin DNA*)
TAMs – su naviku susiję makrofagai (angl. *Tumor Associated Macrophages*)
TLR – į *Toll* geno koduojamą baltymą panašūs receptoriai (angl. *Toll-Like Receptor*)
TLR4 – TLR šeimai priklausantis receptorių 4 (angl. *Toll-Like Receptor 4*)
TNF- α – naviko nekrozės veiksnys α (angl. *Tumor Necrosis Factor α*)
TP53 – naviką slopinantis genas (angl. *Tumor Protein 53*)
TPA (arba PMA) – 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetatas (angl. *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate*)

ĮVADAS

NF-κB veiksniai atlieka svarbų vaidmenį įvairiuose fiziologiniuose procesuose: imuninio atsako ir uždegimo mechanizmuose, organizmo vystymesi, ląstelių dalijimesi, išgyvenime, apoptozėje ir kt. (Kuri et al., 2017). NF-κB signalinio kelio aktyvaciją sukelia mikrobinės ar virusinės infekcijos, poveikis mitogenais, uždegimą skatinantys citokinai. Šio kelio metu yra paskatinama įvairių genų transkripcija, tame tarpe ir citokinų bei jų receptorių (El-Guendy, Sinai, 2008).

Sutrikdytas NF-κB kelias yra siejamas su įvairiomis ligomis: vėžiniais susirgimais, autoimuninėmis ligomis, nuolatinio uždegimu, neurologinėmis ligomis ir kt. (Zeuner et al., 2017; Kuri et al., 2017). Tiriant NF-κB veiksnį raišką ir jų kelią, galima išsiaiškinti, kaip vyksta NF-κB aktyvacija patologiniuose procesuose, tokie tyrimai gali padėti uždegiminių ligų ir kitų patologijų gydyme (Badr et al., 2009; Afonina et al., 2017). NF-κB kelias yra ir vienas iš vaistų taikinių vėžinių susirgimų terapijoje. Yra tiriami įvairūs NF-κB kelio slopikliai ir jų paklausa tik didėja.

Dažnai naujų vaistinių medžiagų tyrimams naudojamos reporterinės sistemos (El-Guendy, Sinai, 2008). NF-κB kelio veikla stebima vėžinių ląstelių modelinėse sistemose, į kurias įvedamos NF-κB atsako reporterinės sistemos, naudojant nevirusinius vektorius (Osorio et al., 2013). Naudojamos būtent nevirusinės sistemos, kadangi virusinės sistemos turi tam tikras dalis, kurios gali sukelti imuninės sistemos atsaką (Shirley et al., 2020). NF-κB atsako reporterinės sistemos yra kaip įrankis, kuris leidžia stebėti NF-κB kelio aktyvumą tiek *in vitro*, tiek ir *in vivo* (Badr et al., 2009). Šį įrankį galima naudoti ir organizmo vystymosi tyrimams (pvz., *Danio rerio*), NF-κB kelio atsako į uždegiminius stimulus stebėjimui (Kuri et al., 2017).

Šiame darbe buvo sukurtos NF-κB reporterinės sistemos ir atliktas jų efektyvumo tikrinimas. NF-κB reporterinės sistemos buvo sukurtos endogeninio *CCL2* promotoriaus ir *ELAM* promotoriaus pagrindu, panaudojant NF-κB atsako elementus ir ŽFB reporterinį geną. ŽFB raiška buvo paveikiama NF-κB kelią stimuliuojančiais endotoksinais – lipopolisacharidais (LPS). ŽFB gaminamas, tik jei veikia NF-κB kelias, šio baltymo kiekis priklauso nuo NF-κB kelio intensyvumo (El-Guendy, Sinai, 2008). ŽFB yra dažnai naudojamas kaip reporterinis genas, jo raišką ląstelėje galima stebėti tiesiogiai ir laikui bėgant, pasitelkus fluorescencinės mikroskopijos metodą. Sukurtos NF-κB reporterinės

sistemos galėtų būti panaudotos naujų priešvėžinės terapijos priemonių ir būdų veiksmingumo vertinimo tyrimuose.

Darbo tikslas: sukurti NF- κ B reporterines sistemas ir ištirti jų efektyvumą, jas transfekuojuojant į HEK293T, A549, HCT 116, HCT 116^{-p53/-p53} ir HCT 116 shK ląstelių linijas.

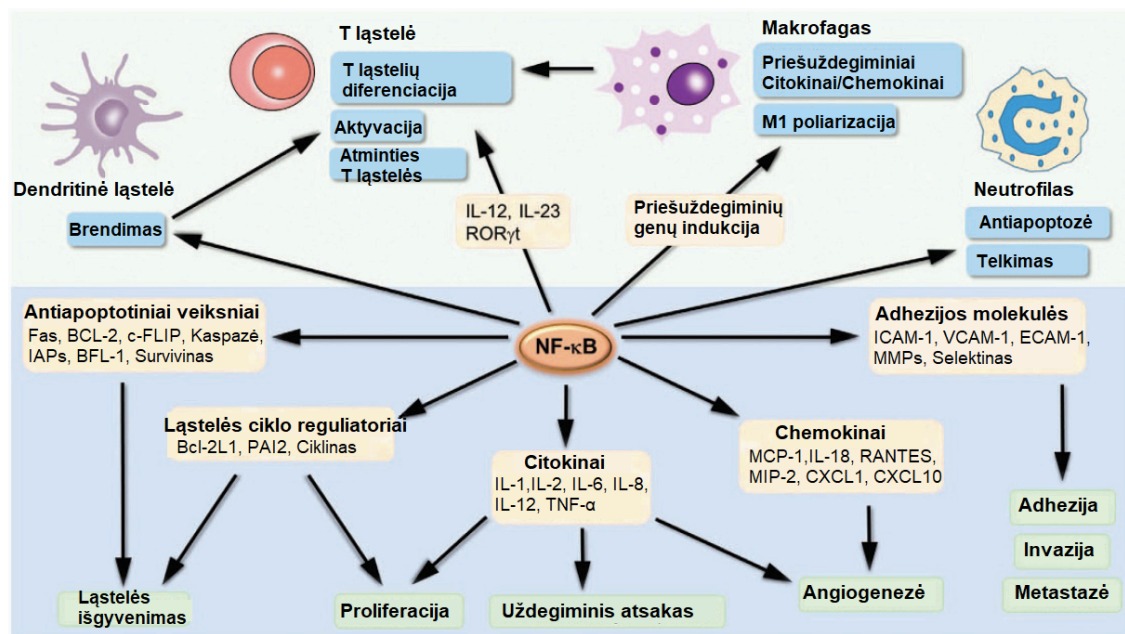
Darbo uždaviniai:

1. PGR metodu amplifikuoti *CCL2* ir *ELAM* promotorių sekas ir jas įklonuoti į bepromotorinį pAcGFP1-1 vektorių.
2. Transformuoti sukurtas reporterines sistemas į kompetentines *Escherichia coli* ląsteles.
3. Patikrinti *CCL2* ir *ELAM* promotorių pagrindu sukurtų konstrukčių struktūrą restrikcijos endonukleazių pagalba.
4. Transfekuoti HEK293T ir A549 ląstelių linijas sukurtais vektoriniais NF- κ B konstruktais.
5. Įvertinti NF- κ B reporterinių sistemų efektyvumą transfekuotuose HEK293T ir A549 ląstelėse, indukuojant lipopolisacharidais (LPS) NF- κ B atsaką.
6. Ištirti NF- κ B sistemų aktyvinimo priklausomybę nuo p53 funkcionalumo po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 NF-κB veiksniai, signalinis kelias ir jo reikšmė

Branduolio veiksniai κB (angl. *Nuclear Factor-κB*, NF-κB) priklauso Rel homologinių domeną turinčiai baltymų šeimai, kuri valdo daugybę genų, susijusių su įvairiais imuniniais ir uždegimo procesais (Liu et al., 2018; Invivogen, 2020). Nors NF-κB veiksniai buvo atrasti prieš daugiau nei 25 m., tačiau jų funkcijų įvairovė vis dar kelia klausimus, kaip keletas veiksnių rinkinys gali sukelti tokius daugybinius atsakus (Babini et al., 2015). NF-κB yra susijęs su visomis uždegiminės reakcijos stadijomis. Jie gauna informaciją apie patogenų buvimą ląstelės aplinkoje per PAMPs (angl. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) receptorius ar per pažeistas, mirštančias ląsteles, kurios išskiria su pažeidomomis susijusias DAMPs (angl. *Damage-Associated Molecular Pattern*) molekules. NF-κB toliau skatina uždegimines reakcijas, stimuliuodami citokinių ir chemokinių gamybą, kurie tada pritraukia imunines ląsteles į pažeidimo ar infekcijos vietą. Šie veiksniai taip pat skatina ląstelių savignyją, nes padidina antiapoptotinių veiksnių, molekulių, apsaugančių nuo ROS, gamybą. NF-κB valdo ir augimo, angiogeninių veiksnių raišką, kad būtų galima po uždegimo atstatyti audinių vientisumą (Gudkov et al., 2011). Dar NF-κB kelias valdo imuninių ląstelių veikimą, diferenciaciją ir aktyvavimą (Kaltschmidt et al., 2019; Liu et al., 2018) (1.1 pav.).



1.1

1.1 pav. NF-κB kelio taikiniai genai, kurie susiję su uždegiminėmis reakcijomis ir kitomis funkcijomis. Šie veiksniai be uždegiminių procesų taip pat kontroliuoja ląstelės dalijimąsi, apoptozę, diferenciaciją, morfogenezę, imuninių ląstelių brendimą, aktyvaciją, išgyvenimą, jų telkimą į tam tikras vietas (Liu et al., 2017)

Šių veiksnių šeimą sudaro penki struktūriškai giminingi nariai: NF-κB1 (p50, koduoja *NFKB1* genas), NF-κB2 (p52, koduoja *NFKB2*), RelA (p65), RelB ir RelC. Jie sudaro homo- ar hetero- dimerus (Liu et al., 2018). Gali suformuoti iki 15 skirtingų transkripcijos veiksnių (Thoma et al., 2018). Geriausiai žinomas yra p50 ir RelA NF-κB kompleksas. RelA taip pat dar gali jungtis ir su p52. NF-κB skatina tam tikrų genų raišką, kurie susiję su įgimtu ir įgytu imuniniu atsaku. Šie veiksniai prisijungia prie specifinio DNR elemento – κB stipriklio (angl. *enhancer*) (Kuri et al., 2017; Jutz et al., 2017; Liu et al., 2018; Invivogen, 2020). NF-κB veiksniai taip pat jungiasi ir prie savo slopiklio geno, taip skatindami neigiamą grįžtamąjį ciklą (Babini et al., 2015). Šie veiksniai pirma rasti žmogaus B ląstelėse, tačiau vėliau nustatyta, kad jie yra ekspresuojami ir visų gyvūnų karalystės atstovų ląstelėse. Nustatyta, kad NF-κB ekspresuojami visose žmogaus ląstelėse (Brücher et al., 2019). NF-κB gali jungtis prie daugybės genų, tačiau tai priklauso nuo ląstelės tipo. Pavyzdžiui, žinoma, kad vienbranduolinėse mieloidinėse ląstelėse jie reguliuoja citokinų (kaip IL-6, IL-8, IL-1, TNF-α), chemokinių (kaip CCL2), įvairių transkripcijos veiksnių, antimikrobinių baltymų, interferono stimuliuojamų genų raišką; sąnarių ląstelėse irgi aktyvuojami panašūs citokinai (IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-8), veiksnys RANKL, kuris su IL-8 skatina trapląstelinio užpildo metaloproteinazių (angl. *Matrix Metalloproteinases*, MMPs) ir tuo pačiu NF-κB veiksnių gamybą (Dorrington, Frazer, 2019; Huang, Kraus, 2016). Nenormali NF-κB veiksnių aktyvacija taip pat, kaip ir nekontroliuojama uždegiminė reakcija, gali nulemti įvairias autoimunines, uždegimines ligas, vėžio išsivystymą ir progresavimą, neurologines ligas (pvz., Alzheimerio ligą) ir kt. NF-κB kelio tyrimai gali padėti geriau suprasti organizme vykstančias uždegimines reakcijas ir prisidėti prie uždegiminių ligų gydymo (Zeuner et al., 2017; Park, Hong, 2016).

1.1.1 NF-κB valdymas, kanoninis ir nekanoninis signalinis kelias

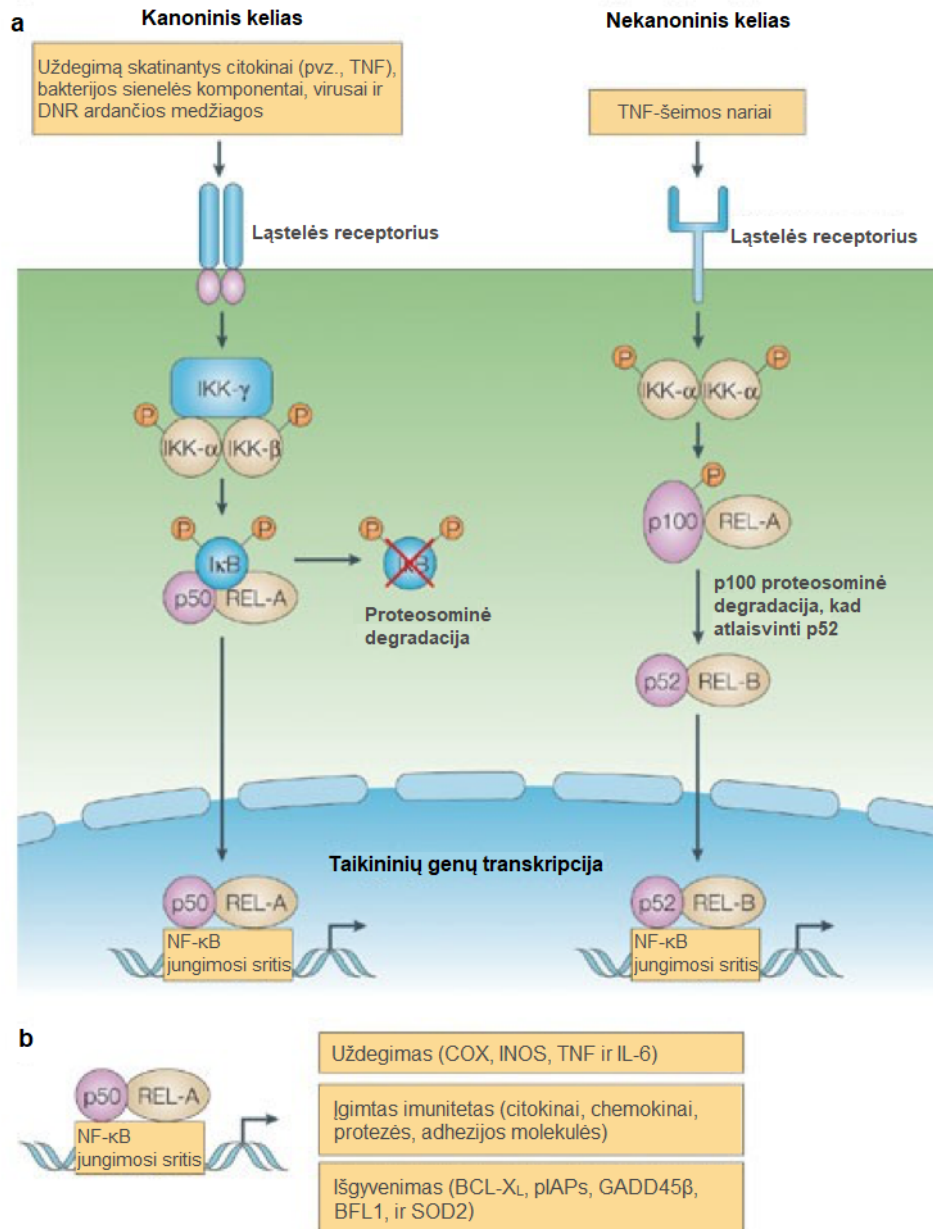
NF-κB baltymai yra kontroliuojami citoplazmoje jų baltymų-slopiklių, kurie priklauso IκB (pvz.: IκBα, IκBβ, BcL-3) šeimai arba jiems giminingiems baltymams, turintiems ankyrino (angl. *ankyrin*) pasikartojimus (Liu et al., 2017). Ankyrino pasikartojimai vieni iš dažniausių pasikartojimų baltymuose, sudaryti iš 30-34 aminorūgščių, funkcionuoja kaip tarpininkas tarp baltymų sąveikų (Li et al., 2006). Geriausiai žinomas NF-κB slopiklis yra IκBα (angl. *NF-κB inhibitor alpha*), dar žinomas kaip NFKBIA. NF-κB baltymų pirmtakai (pvz.: p100, p105) taip pat veikia kaip NF-κB baltymų slopikliai, kadangi jie turi C

terminalinę struktūrą, kuri primena IκB struktūrą. NF-κB aktyvacija apima du signalinius kelius – kanoninį (klasikinį) ir nekanoninį (alternatyvųjį) kelią. Jie reguliuoja imuninį, uždegiminį, streso atsaką, nulemia, ar ląstelė išgyvens (Liu et al., 2018; Abraham et al., 2019). NF-κB kelią gali aktyvuoti daugiau nei 150 skirtingų stimulų (Correa et al., 2004).

Kanoninį NF-κB kelią gali stimuliuoti įvairūs ligandai, pavyzdžiui: LPS, naviko nekrozės veiksnys TNF-α, interleukinas IL-1; taip pat uždegiminį signalą sukelia PAMPs DAMPs, B ląstelių mitogenai, virusų baltymai, oksidacinis stresas ir kt. (Khongthong et al., 2019; Manjunatha et al., 2020). Signalinės molekulės jungiasi prie citokinų receptorių, prie patogenų molekules atpažįstančių receptorių (angl. *Pattern-Recognition Receptors*, PRRs), TNF receptorių, T ląstelių ir B ląstelių receptorių (Liu et al., 2017). NF-κB veiksniai taip pat gali būti aktyvuojami ir per augimo veiksnių (pvz., EGFR) receptorius. PRRs receptorius, kurie aktyvuoja NF-κB, sudaro: IL-1R, TLR šeimos atstovai – TLR3, TLR4, TLR7 (Pires et al., 2018; Nakatsumi et al., 2017). Signalų perdavimo pavyzdys – prisijungus LPS prie TLR4 receptoriaus, jis pritraukia MYD88, TRIF per Mal ir TRAM baltymus. Tada aktyvuojamas IKK kompleksas, o šis išlaisvina NF-κB veiksnius, kurie keliauja į branduolį ir skatina įvairių genų raišką. MYD88 ir TRIF baltymai pačiu metu dar gali aktyvinti ir MAPK/AP1, TKB1/IRF3 signalinius kelius (Fu et al., 2020).

Pagrindinis kanoninio NF-κB kelio paskatinimo mechanizmas - IκBα skaidymas. Jis vyksta, kai IκB kinazės kompleksas (IKK) fosforilina IκBα, kad šis būtų suskaidytas. Šis kompleksas yra sudarytas iš dviejų katalitinių dalių: vieną sudaro IKKα ir IKKβ, kitą – IKKγ (NEMO) reguliacinis subvienetas (Xia et al., 2018). IKK gali būti valdomi įvairių stimulų, pvz.: citokinų, augimo veiksnių, mitogenų, mikroorganizmų sudėtinių dalių ir kt. stresą sukeliančių darinių. Proteosomos pagalba suskaidžius IκBα, skatinamas kanoninių NF-κB veiksnių (pvz., p50/RelA ir p50/RelC) translokavimas iš citoplazmos į branduolį (Liu et al., 2017). NF-κB kompleksai branduolyje jungiasi prie κB sričių (5'-GGGRNNYYCC-3', kur R – purinas, Y – pirimidinas, N – bet koks nukleotidas) (Pires et al., 2018). Tačiau jungimosi afiniškumas prie įvairių κB sričių skiriasi, nes kiekvienai būdingas tam tikras specifiškumas ir funkcija (Siggers et al., 2012). Šios sritys yra būdingos NF-κB genų-taikinių promotoriams. Branduolio veiksniai κB gali jungtis su kitais transkripcijos veiksniais, pavyzdžiui: AP-1 (c-Jun/cFos kompleksu), chromatino struktūrą keičiančiais baltymais (CBP, p300) ir kitais veiksniais. Sąveikos su įvairiais transkripcijos veiksniais gali keisti NF-κB gebėjimą jungtis prie jų atsako promotorių ir taip reguliuoti genų-taikinių raišką (Pires et al., 2018).

Nekanoninis NF- κ B kelias aktyvuojamas per mažos grupės stimuliatorių receptorius: LT β R, BAFFR, CD40 ir RANK. Šiam keliui nėra būdingas I κ B α suskaidymas, bet šiuo atveju yra veikiamas p100 baltymas. Pagrindinė nekanoninio kelio molekulė yra NF- κ B kelią skatinanti kinazė NIK (angl. NF- κ B-inducing kinase). Ji kooperuojasi su IKK α , aktyvina šį kompleksą, kad būtų pradėtas p100 suskaidymas. Dėl to gali būti subrandinamas p52 baltymas ir perkeltas į branduolį p52/RelB kompleksas. Kanoninis NF- κ B kelias yra įjungiamas visais imuninio atsako atvejais, o nekanoninis kelias veikia kaip pagalbinė kanoninio kelio atšaka, vykstant organizmo vystymosi procesams ar kai yra reguliuojama adaptyvi imuninė sistema (Liu et al., 2017). Įprastai kanoninis kelias labai greitai įjungiamas ir yra trumpalaikis, o nekanoninis išlieka aktyvus ilgesniam laikotarpiui (Sánchez-Maldonado et al., 2020) (1.2 pav.).



1.2 pav. NF- κ B kanoninis (arba klasikinis) ir nekanoninis (arba alternatyvusis) signaliniai keliai. A – Kanoninis yra aktyvuojamas uždegiminių citokinių, bakterijos sienelės komponentų, virusų ir kt. Tada I κ B kinazės kompleksas fosforilina I κ B, kuris yra pažymimas suskaidymui, tokiu būdu išlaisvinami p50 ir RelA(REL-A) NF- κ B veiksniai, kurie patenka į branduolį. Nekanoninis kelias aktyvuojamas TNF šeimos narių, čia I κ B kinazės kompleksas pažymi p100 suskaidymui ir tokiu būdu paleidžiamas p52 ir kartu su RelB (REL-B), jie tada gali pradėti vykdyti genų transkripciją. B – p50 ir RelA kompleksas skatina tam tikrų uždegiminių, imuninio atsako ir su ląstelės išgyvenimu susijusių genų raišką (Karin, Greten, 2005)

1.1.2 NF- κ B ir imuninis atsakas

Uždegiminė reakcija yra šeimininko atsakas į infekcijas, audinio pažeidimus. Jos metu vyksta kraujagyslių išsiplėtimas, imuninių ląstelių, plazmos baltymų aktyvavimas, jie

susitelkia ties uždegimo, pažeidimo vieta. Įprastai uždegiminė reakcija yra naudinga organizmui, nes tokiu būdu organizme yra išsprendžiama iškilusi problema. Tačiau išreguliuavus uždegiminius kelius, gali būti sukelti dideli, ilgalaikiai audinio pažeidimai. NF- κ B kelias yra pagrindinis tarpininkas, kuris reguliuoja uždegiminių genų veiklą, tiek įgyto, tiek ir įgimto imuniteto ląstelėse (Liu et al., 2017). Įgyto imuniteto ląstelių, kaip makrofagų ir dendritinių ląstelių, veikla yra priklausoma nuo NF- κ B veiksmų, jų pagalba yra sekretuojami citokinai. NF- κ B kelias yra svarbus įgyto imuniteto ląstelių – B ir T limfocitų, neutrofilų, vystymuisi, jose yra skatinama išgyvenimo ir brendimo veiksmų raiška. Branduolio veiksniai κ B padeda aktyvuoti ir skirtingas T CD24+ ląsteles. Jie taip pat yra esminės dalys formuojantis įgimtam imunitetui, NF- κ B padeda diferencijuotis mieloidinių ląstelių pirmtakams, skatina GM-CSF veiksmo signalo perdavimą. Šie veiksniai yra pagrindiniai veikėjai citokinų ir chemokinų valdyme, padeda IgE aktyvuoti skirtingas mieloidines ląsteles (pvz.: eozinofilus ir putliąsias ląsteles). Skatina perforino ir IFN- γ gamybą NK ląstelėse. Nors NF- κ B žinomi kaip uždegiminių reakcijų sukėlėjai, tačiau, pvz., p50 homodimerai neturi transaktyvacijos domeno ir gali slopinti makrofaguose esančių citokinų veiklą (Pires et al., 2018).

1.1.3 NF- κ B ir vėžio vystymasis

Ryšis tarp uždegiminių reakcijų, susijusių su NF- κ B veiksniais ir vėžio atsiradimu, yra jau seniai pastebėtas (Yu et al., 2019). Pastovus uždegiminio kelio įjungimas ir kitos sutrikusio NF- κ B kelio funkcijos yra siejamas su vėžio vystymusi (Fusella et al., 2017). Uždegiminės reakcijos vėžio atsiradime atlieka svarbų vaidmenį, net jei jo vystymesi nėra pastebimų uždegimo ženklų (Taniguchi, Karin, 2018). Imuninė sistema navikus veikia dvejopai. Iš vienos pusės, uždegimą skatinančių molekulių gamyba pastiprina vėžio vystymąsi, progresavimą, atsparumą gydymui. Iš kitos pusės, imuninės sistemos paskirtis yra veikti ir prieš navikines ląsteles – jas atpažinus sunaikinti (Collignon et al., 2018). Tikslus uždegiminių reakcijų mechanizmas vėžio atveju nėra nustatytas, tačiau žinoma keletas variantų, kaip tai gali vykti. Vienas iš jų, kad dėl imuninio atsako susidariusios reaktyvios deguonies formos ir kiti potencialiai kenksmingi tarpininkai gali sukelti ląstelių genetinį nestabilumą. Dažnu vėžio atveju yra aktyvuojami ir NF- κ B veiksniai, kadangi jie yra esminiai uždegiminių reakcijų skatintojai, naudingi vėžinių ląstelių piktybėjimui (Pires et al., 2018). NF- κ B veiksmų ir vėžio išsivystymo tyrimai buvo pradėti vykdyti, kai nustatyta, kad vėžio atveju šios šeimos nariai yra mutavę (Xia et al., 2014). Pastebėta, kad NF- κ B skatina

antiapoptotinių (pvz.: IAPs, BCL2 šeimos narius), augimo veiksnių (pvz., G-CSF) ekspresiją, ląstelių išgyvenamumą, kas dažnai lemia ir atsparumą vaistams (Pires et al., 2018, Tornatore et al., 2014). Veikiant šiems veiksniams, ląstelėje yra aktyvinami genetiniai, epigenetiniai pasikeitimai, EMT – epitelinis-mezenchiminis virsmas. Šie procesai nulemia greitesnę ląstelės piktybėjimą (Taniguchi, Karin, 2018). Taip pat pastovūs uždegiminiai procesai gali pritraukti uždegimą skatinančias ir reguliacines imuniteto ląsteles, kurios tą problemą spręskatindamos ląstelių proliferaciją ir angiogenezę. Tokiu būdu bus apsaugotos vėžinės ląstelės nuo imuninių ląstelių, kurios galėtų jas nužudyti, ir tuo pačiu galės greičiau dalintis. Navikas veiks kaip žaizda, kuri niekad neužgyja (Yoshimura, 2018). Šių veiksnių ekspresija susijusi su daugeliu skirtingų vėžio atvejų. Pvz.: NF-κB įtaka yra nustatyta krūties, kiaušidžių, prostatos, plaučių, kepenų, skrandžio, žarnyno vėžių atvejais, taip pat leukemijos, limfomos atvejais. Branduolio veiksnių κB aktyvacija susijusi ir su visomis vėžio stadijomis. NF-κB taip pat skatina dalijimosi veiksnių raišką, kaip c-Myc ir ciklino D1, navikinių ląstelių atsparumą chemoterapijai, radioterapijai, slopina apoptozę (Pires et al., 2018; Yang et al., 2018, Collignon et al., 2018; Taniguchi, Karin, 2018). Padidėjęs NF-κB veiksnių aktyvumas, lemia didesnę citokinių ir kitų uždegimą skatinančių junginių kaupimąsi, sukuria vėžio vystymuisi draugišką aplinką. Pavyzdžiui, žmonės, kurie turi uždegiminę žarnyno ligą, serga dažniau storosios žarnos vėžiu. Taip yra, kadangi jų žarnyne esančios imuninės ląstelės daugiau skatina NF-κB veiksnių veiklą, o tuo pačiu ir uždegimines reakcijas, sudarydamos palankesnę terpę atsirasti pakitusioms ląstelėms (Xia et al., 2014).

NF-κB veiksniai atlieka svarbų vaidmenį – jie prisideda ne tik prie vėžio vystymosi, patogenezės, bet ir prie metastazavimo (Yoshimura, 2018). NF-κB reguliuoja MMPs ekspresiją, EMT, kuris yra ankstyvas reiškinys metastazavimo procese. EMT procesą reguliuoja Twist1 veiksnys. Nustatyta, kad jis yra vienas iš NF-κB taikinių krūties vėžio ląstelėse. Vėžinėse ląstelėse baltymas CSN2 prisideda prie NF-κB aktyvacijos ir taip yra paskatinama ląstelių migracija ir invazija. Taip pat NF-κB skatina ląstelių adhezijos molekulių gamybą, pvz.: selektinų, integrinų. Jos yra svarbios vėžinėms ląstelėms metastazuojant į kitas organizmo vietas. Taigi, aktyvus NF-κB kelias gali sudaryti palankią terpę vėžinėms ląstelėms įsitvirtinti į naują vietą (Xia et al., 2014).

Mikroorganizmai – virusai ir bakterijos, irgi prisideda prie NF-κB aktyvacijos vėžio atvejuose. Ypač esant dažnoms infekcijoms, organizme daugiau skatinamos ir uždegiminės reakcijos, kuriose dalyvauja NF-κB veiksniai. Pavyzdžiui, manoma, kad *Helicobacter pylori* – gramneigiama bakterija, per NF-κB kelią skatina uždegiminio citokino IL-8 ekspresiją, o šis

prisideda prie kancerogenezės. Taip pat nustatyta, kad Epštein-Barr virusas per NF- κ B kelią skatina limfomos atsiradimą (Pires et al., 2018; Yoshimura, 2018; Badr et al., 2009).

Tačiau ne visuose organizmo vietose dėl nuolatinų uždegimų gali išsivystyti vėžys. Pastebima, kad dėl uždegiminių reakcijų navikai dažniau atsiranda žarnyne, kepenyse. Manoma, kad nuolatinės infekcijos ir uždegiminiai procesai yra atsakingi už 15-20 % mirčių nuo vėžio pasauliniu mastu. Taigi, didelis skaičius atvejų, kai NF- κ B veiksniai prisideda prie vėžio vystymosi, lemia, kad šie veiksniai yra potencialūs terapiniai taikiniai (Taniguchi, Karin, 2018).

1.1.4 Kitos NF- κ B funkcijos

NF- κ B kelias taip pat gali reguliuoti inflamasmų veikimą. Inflamasomos yra daugiabaltyminiai vidiniai ląstelės kompleksai. Jie reaguoja į patogeninius mikroorganizmus, jų darinius ir į stresorius, kurie nėra susiję su mikroorganizmais (pvz.: į molekules, kurios yra susiję su nekrotinėmis ląstelėmis ar audinių pažeidimais). Inflamasomos aktyvuoja uždegimines kaspazes. Kanoninės inflamasmos turi receptorių, prie kurių jungiasi tam tikri ligandai. Jų receptoriams priklauso NLR baltymų šeimos nariai, AIM2. Inflamasomos dar turi ASC adaptorinį baltymą ir prokaspazę 1 (Liu et al., 2017). NF- κ B veiksniai kontroliuoja NLR baltymų šeimai priklausančio NLRP3 baltymo ekspresiją. Po stimuliavimo stresoriais, ląstelė įdarbina NF- κ B veiksnius, kurie skatina inflamasmos NLRP3 baltymo gamybą. Šis tada veikia ASC baltymą, įdarbinama prokaspazė 1, kuri verčiama į aktyvią kaspazę. Aktyvi kaspazė 1 kerpa pro-IL-1 β ir pro-IL-18 į aktyvias baltymų formas, tada šie citokinai pradeda sekretuoti ir taip toliau skatinamas uždegimo procesas (Zhao et al., 2019).

Žinoma, kad NF- κ B dalyvauja ląstelės atsake į jonizuojančiosios spinduliuotės (JS) sukeltas pažeidas. Jonizuojanti spinduliuotė sukelia DNR pažeidimus ir reaktyvių deguonies formų susidarymą, aktyvina įvairių ląstelės signalinių kelių kaskadas, tame tarpe ir imuninio atsako. Yra tiriama jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis ląstelei, kaip paveikia NF- κ B reguliaciją, kelio dinamiką (Babini et al., 2015). Ne tik radioterapija, bet ir chemoterapija paveikia NF- κ B kelią. Chemoterapijos metu irgi yra sukeltos DNR pažeidos, genotoksinis stresas, kuris iššaukia imuninį atsaką. Tai gali paskatinti navikines ląsteles išvystyti atsparumą gydymui, o po to ir pačio naviko atsinaujinimą (Taniguchi, Karin, 2018). Tokio pobūdžio tyrimai gali padėti geriau suprasti, kas vyksta sveikuose audiniuose, kai jie yra paveikiami radioterapija ar chemoterapija (Babini et al., 2015).

Taip pat NF- κ B yra susiję su patogenezės procesais, vykstančiais daugelyje uždegiminių ligų. Pavyzdžiui: vyksta reumatoidinio artrito, uždegiminės žarnyno ligos, daugybinės sklerozės, aterosklerozės, sisteminės raudonosios vilkligės, pirmo tipo diabeto, lėtinės obstrukcinės plaučių ligos ir astmos atveju. Kadangi skiriasi stimulo pobūdis tarp ląstelių, NF- κ B vaidmuo tampa kompleksinis skirtingų ląstelių ir ligų atveju gydyme (Liu et al., 2017).

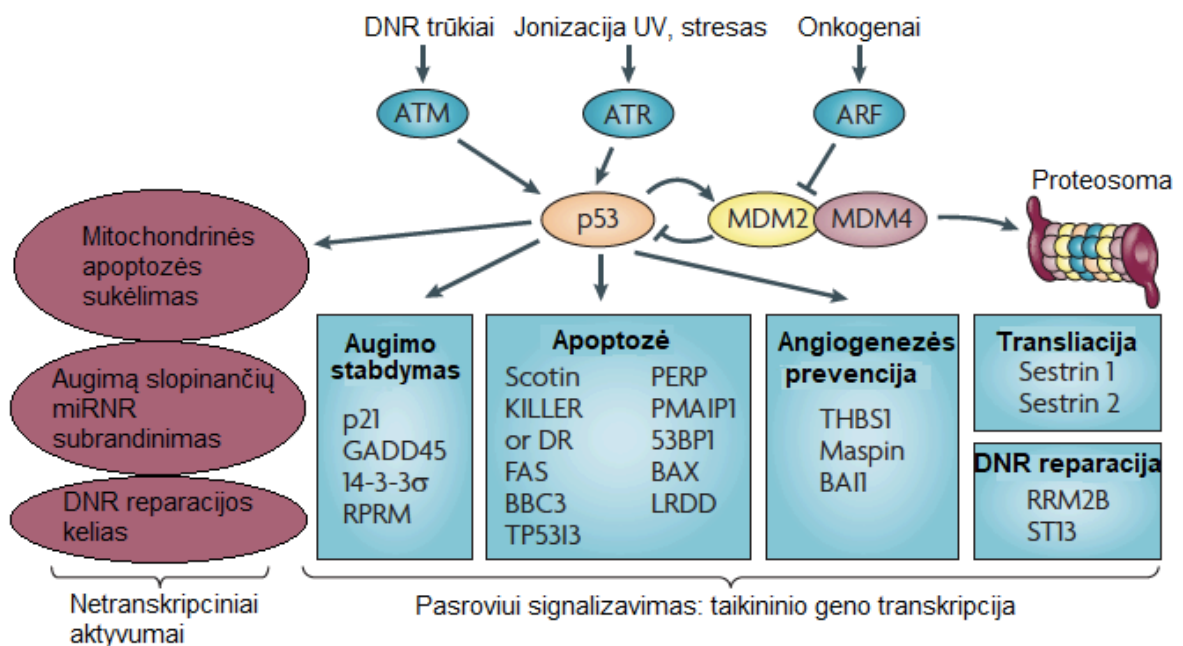
1.1.5 NF- κ B slopikliai

Kadangi NF- κ B kelio išreguliavimas prisideda prie nemažos dalies uždegiminių ligų, nemažą potencialą gydyme turi terapijos, susijusios su taikymusi į NF- κ B kelią (Liu et al., 2017). Vėžinės ligos atveju, NF- κ B slopinimas galėtų būti naudinga terapinė strategija. Naudojant NF- κ B slopiklius, piktybinėse ląstelėse būtų paveikiamas jų išgyvenimo mechanizmas ir jos taptų jautresnės apoptozę skatinančioms medžiagoms, o uždegiminėse ląstelėse slopikliai stabdytų augimo ir išgyvenimo veiksnių gamybą (Karin, Greten, 2005). Blokuojant NF- κ B veiklą, galima paskatinti ne tik apoptozę, bet ir nekrotozę (Verzella et al., 2020). Yra žinomi jau sukurti įvairūs NF- κ B kelio slopikliai. Pavyzdžiui: IKK slopikliai, kurie blokuoja IKK aktyvumą ir neleidžia vykti I κ B α fosforilinimui; žinomi antiuždegiminiai vaistai – aspirinas ir salicilatas, irgi geba blokuoti IKK; proteosomų slopikliai – velkadas ir laktacistas, blokuojantys I κ B α suskaidymą proteosomoje; slopikliai (pvz., takrolimus), kurie neleidžia vykti NF- κ B veiksnių perkėlimui į ląstelės branduolį; vaistai (gliukokortikoidai, PPAR agonistai), kurie sutrikdo NF- κ B jungimosi prie DNR funkciją (Liu et al., 2017). NF- κ B kelio slopiklis parthenolidas stabdo NF- κ B, STAT3 veiklą, taip pat sumažina TLR4 gamybą. Slopina naviko vystymąsi krūties, skrandžio, prostatos ir storosios žarnos vėžio atvejais (Fu et al., 2020). Tačiau yra tyrimų, kurie rodo, kad globalus NF- κ B kelio stabdymas gali sukelti ir stiprius šalutinius padarinius. Dėl to yra svarbu geriau suprasti, kaip vyksta NF- κ B kelio mechanizmas įvairių ligų atveju, kad galima būtų sukurti atitinkamus, pagal ligos pobūdį, terapinius agentus (Liu et al., 2017).

1.2 p53 ir jo sąsaja su NF- κ B veiksniais

TP53 yra naviką slopinantis genas. Jo funkcijos, iš esmės, apima ląstelės atsaką į stresą reguliavimą. p53 reaguoja į dvigrandes DNR pažaidas, dėl to yra vadinamas „genomo sargu“. Jis yra vienas iš dažniausiai mutuojančių genų navikinėse ląstelėse, prisideda prie vėžio vystymosi (Hafner et al., 2019, Liu et al., 2009). Geną gali inaktyvuoti jame atsiradusios

mutacijos, jis taip pat gali būti inaktyvuotas dėl signalinio kelio sutrikimo, kuriame jis pats ir dalyvauja. Įvairių navikų atveju p53 gali būti išveiklinamas padidinus jo slopiklį – MDM2 ir MDM4, raišką, bei sumažinus ARF (dar kitaip p14) raišką. ARF yra MDM2 slopiklis, jis neleidžia vykti p53 suskaidymui, taip jį stabilizuodamas. Pastebėta, kad atkūrus navikinėse ląstelėse p53 veikimą, gaunamas efektyvus priešvėžinis poveikis. p53 veikia kaip transkripcijos veiksnys. Jį aktyvuoja DNR pažeidimai, hipoksija, onkogenų aktyvacija, ribosomų stresas. p53 gali stabdyti ląstelės ciklą (pvz., per p21 baltymo gamybą), skatinti DNR pažeidimų ištaisymą, ląstelės programuotą mirtį – apoptozę (tas gali vykti per, pvz.: BAX, PUMA, NOXA gamybą), senėjimą, augimo slopinimą ir metabolinius pakitimus (1.3 pav.) Taip pat reguliuoja tokius organizmo procesus kaip kamieninių ląstelių būseną, vystymąsi, audinių homeostazę. Nesant aktyvaus p53, vyksta kamieninių ląstelių homeostazės išreguliavimas, metabolizmo, autofagijos, angiogenezės, migracijos ir invazijos sutrikimai. Šie pakytimai yra svarbi vėžio vystymosi dalis (Liu et al., 2009; Brown et al., 2009; Cui, Guo, 2016; Gudkov et al., 2011).



1.3 pav. p53 kelias ir jo funkcijos. Šis baltymas yra sudėtingo biologinių sąveikų tinklo centre, nulemia ar ląstelė išgyvens, ar mirs. Reaguoja į DNR trūkių, UV šviesos, onkogenų sukeltus ląstelės signalus, veikia ląstelės augimo, apoptozės, angiogenezės, DNR reparacijos ir kt. procesus (Brown et al., 2009)

Įprastomis sąlygomis p53 yra palaikomas mažais kiekiais E3 ubikvitino ligazės MDM2 ir jam talkinančio MDM4 baltymo pagalba. Šie baltymai ubikvitilindami pažymi p53, kuris po to yra skaidomas proteosomoje. Esant stresinėms sąlygoms, MDM2-MDM4 komplekso

veikla yra blokuojama fosforilinant ARF baltymui. Tada laisvas p53 yra aktyvinamas jį fosforilinant (tai atlieka ATM ir ATR, ir/arba Chk1/2). Taip yra stabilizuojama šio baltymo struktūra. Kadangi p53 nebesijungia su MDM2, jis pradeda ląstelėje kauptis. Vis daugiau šio baltymo ima jungtis prie tam tikrų DNR sričių. Įdomu tai, kad MDM2 baltymo genas taip pat yra ir p53 transkripcijos taikiny. Taigi, tokiu neigiamo grįžtamojo atsako būdu vyksta ir paties p53 baltymo reguliacija (Hafner et al., 2019; Brown et al., 2009). p53 taip pat turi svarbų vaidmenį uždegiminėse, imuninėse reakcijose. Jis gali reguliuoti TLR baltymų šeimos atstovus ir paskatinti nuo TLR priklausomų citokinų raišką. Tačiau panašu, kad toks TLR valdymas, priklausomas nuo p53, būdingas tik žmogaus ląstelėms. Pvz., pelėse TLR promotorių regionai nėra tokie konservatyvūs, jie yra reguliuojami ir kitų veiksnių.

p53 ir NF-κB aktyvavimo procesai yra panašūs. Abiem būdingas šių veiksnių slopiklių suskaidymas, kuris yra skatinamas streso signalų. Streso metu MDM2 yra modifikuojamas ir nebegali jungtis su p53. Taip stabilizuotas p53 gali persikelti į ląstelės branduolį. Tuo tarpu esant stimului, NF-κB veiksniai, kurie įprastai dėl sąveikos su IκB laikomi citoplazmoje, yra paleidžiami keliauti į branduolį ir vykdyti transkripciją. O IκB, vykdant modifikaciją IKK komplekso pagalba, yra siunčiamas suskaidymui. Taigi, abiejų tipų veiksniai keliauja į branduolį, kur stimuliuoja savo genų-taikinių raišką. Taip pat jie yra dažnai išreguliuojami vėžio atvejais. Nors šie transkripcijos veiksniai yra įdarbinami esant panašioms stimulams, tačiau biologinės pasekmės ląstelei, iš esmės, yra skirtingos. NF-κB yra susiję su ląstelės išgyvenimu ir augimu, o p53 su ciklo stabdymo, senėjimo ir apoptozės skatinimu (Lowe et al., 2014; Gudkov et al., 2011). Aktyvuoti p53 ir NF-κB veiksniai taip pat skatina genų, kurių produktai veikia prieš juos antagonistiškai, transkripciją. Sudaromos neigiamo grįžtamojo ryšio kilpos, kurios efektyviai kontroliuoja procesų stabdymą, paversdamos juos laikiniais ir oscilijuojančiais (Cui, Guo, 2016). Nors šie veiksniai veikia kaip antagonistai vienas kito atžvilgiu, yra atvejų, kai jie veikia ir kartu (Lowe et al., 2014).

Pastebėta, kad vėžinėse ląstelėse tarp p53 baltymo ir NF-κB veiksnių yra dvipusis reguliacinis ryšys. Jose šie transkripcijos veiksniai iš dalies atlieka priešingas funkcijas: NF-κB skatina uždegiminę reakciją, slopina apoptozę, tuo tarpu p53 skatina ląstelės ciklo stabdymą ir taip pat aktyvina apoptozės mechanizmą. Nustatyta, kad NF-κB slopina p53 transkripcinį aktyvumą, o tai yra vienas pagrindinių mechanizmų, kuris siejasi su vėžio išsivystymu. Pavyzdžiui, viena iš NF-κB šeimos molekulių – Bcl-3, reguliuoja MDM2 raišką, taip slopindama p53. Kitas NF-κB subvienetas – p52, gali jungtis prie p21 geno promotoriaus (kuris taip pat yra p53 taikiny) ir stabdyti p53 vykdomą to geno transkripciją. O kaip p53 reguliuoja NF-κB veikimą kol kas nėra iki galo aišku. Tikėtina, kad p53 paskatina IκBα

raišką ir taip sumažina NF-κB veiksmų aktyvumą. Taip pat jis gali slopinti IKK veiklą, o tuo pačiu ir NF-κB aktyvumą, apriboja CBP ir p300 baltymų jungimąsi su NF-κB ir sumažina tam tikrų NF-κB genų-taikinių raišką (Liu et al., 2009). Kituose moksliniuose tyrimuose teigiama, kad p53 gali inaktyvuoti NF-κB kelią tiesiogiai jungdamasis prie NF-κB subvieneto p65 promotoriaus (Cui, Guo, 2016).

Tiriant p53 mutantus, mokslininkai pastebėjo, kad suaktyvėjo NF-κB subvienetų raiška, įskaitant ir p100. Tyrime pelių linijos, kurioje yra išveiklintas p53 (kitais būdais yra -p53/-p53), neutrofilų ir makrofagų ląstelės, turėjo stipresnį atsaką į LPS, lyginant su kitos pelių linijos to paties tipo ląstelėmis, kurios turėjo veikiantį p53 (+p53/+p53). Neturintys funkcionalaus p53 ląstelės gamino didesnius kiekius uždegimą skatinančių citokinų (kaip TNF-α, IL-6, MIP-2), NF-κB veiksniai geriau jungėsi prie transkripcinių taikinių. Tačiau tokios -p53/-p53 pelės, dėl padidinto LPS poveikio, turėjo pažeidimus plaučiuose ir buvo silpnesnės – jų išgyvenamumas buvo mažesnis. Buvo patvirtinta, kad p53 neigiamai veikia NF-κB aktyvumą, o nesant p53, NF-κB geriau jungiasi prie savo genų-taikinių (Liu et al., 2009).

Kitais nei daugelyje kitų tyrimų, Lowe ir kt. tyrime nustatyta, kad makrofaguose ir pirminiuose monocituose p53 atlieka imuninį vaidmenį ir teigiamai sąveikauja su NF-κB keliais. Makrofagai yra svarbūs veikėjai imuninės sistemos atsake į vėžį. Tiek p53, tiek ir NF-κB, esant tam tikriems aktyvuojantiems signalams, reguliuoja uždegiminių genų raišką, kaip citokinų (pvz., IL-6, IL-8), chemokinų (pvz., CXCL1). Normaliame audinyje dėl p53 ir NF-κB padidėjusi citokinų ir chemokinų gamyba lemia neutrofilų pritraukimą ir uždegimą. Šis mechanizmas sustiprina makrofagų atsaką į audinio pažeidimus. Esant navikinei aplinkai, makrofaguose p53 yra aktyvuojamas parakrininių vėžinių signalų ir taip paskatina IL-6 ekspresiją. Vadinas, vėžinės ląstelės skatina p53 atsaką makrofaguose, kuris atitinkamai po to veikia vėžines ląsteles. Tikėtina, kad toks poveikis yra naudingas vėžinėms ląstelėms, kuriose dažnai būna išveiklintas p53. Įdomu tai, kad su naviku susijusiuose makrofaguose (angl. *Tumor Associated Macrophages*, TAMs) p53 atlieka kitokį vaidmenį, nei supiktybėjusiose ląstelėse, o p53 aktyvumą TAMs ląstelėse gali skatinti NF-κB veiksniai. Taip pat tikėtina, kad p53 raišką gali skatinti ir kiti veiksniai, kaip M-CSF ir CCL2. Iš vienos pusės, p53 ir NF-κB signalai taip gali skatinti ląstelių senėjimą, iš kitos pusės, citokinai ir chemokinai, įskaitant IL-6 ir CXCL1 turi navikų augimą skatinantį efektą – didina ląstelių išgyvenimo tikimybę, angiogenezę, su navikų susijusių neutrofilų įdarbinimą. Taigi, kokie veiksniai bus ekspresuojami ir koks bus to biologinis poveikis priklausys nuo mikroaplinkos – procesai vyks normaliame ar vėžiniame audinyje (Lowe et al., 2014). Kitame tyrime, atliktame Gudkov ir

kt., taip pat atrasta, kad p53 ir NF- κ B veiksniai gali teigiamai veikti vieni kitų raišką. Buvo nustatyta, kad p53 ir NF- κ B sąveikos pobūdis yra audiniui specifinis (Gudkov et al., 2011).

1.3 NF- κ B reporterinės sistemos

Yra nemažai nuveikta, naudojant endogeninių kelių analizes ir reporterines sistemas, kad ištirti NF- κ B signalinį kelią ar juo manipuluoti. O manipuluoti šiuo keliu nėra paprasta, kadangi NF- κ B kelias yra kompleksinis procesas, apimantis daug elementų. Vienas iš dažnesnių metodų – reporterinių plazmidžių kūrimas, kuriose reporterinio geno ekspresija yra valdoma promotoriaus, turinčio NF- κ B prisijungimo sekas (El-Guendy, Sinai, 2008). Reporterinės sistemos leidžia stebėti baltymų veiklą. Jose reporteriniu baltymu dažniausiai būna įvairūs fluorescuojantys baltymai (Yus et al., 2017). Pavyzdžiui: GFP, YFP ir kiti reporteriniai baltymai; taip pat gali būti naudojama ir liuciferazė, pvz., „Firefly“ (El-Guendy, Sinai, 2008). Įprastai naudojamas žaliai fluorescuojantis baltymas, ŽFB arba GFP (angl. *Green Fluorescent Protein*), kuris pirmą kartą išskirtas iš medūzų *Aequorea victoria* japonų mokslininko Osamu Shimomura (Shimomura et al., 1960). Tyrimams panaudojami ir įvairūs šio baltymo variantai. ŽFB yra svarbus komponentas ląstelių ir audinių atvaizdavime *in vivo* ir žymėjime *in vitro*. Jo junginiai gali būti naudojami analizuoti raiškai, lokalizacijai, judėjimui, sąveikoms su baltymais. ŽFB yra išskirtinis tuo, kad ŽFB fluoroforas ląstelėse susidaro spontaniškai, išskirtos fluorescencijos intensyvumas suteikia tiesioginį baltymo kiekio įvertį, kuris gali būti matuojamas ląstelės lygmenyje, be papildomų procedūrų. Tai ŽFB atsako metodą padaro labai patogiu stebėti reporterines sistemas. Tuo tarpu, lyginant su bioluminescentiniais reporteriais, paremtais „Firefly“ liuciferaze, tokie reporteriai yra priklausomi nuo jų fermentinės veiklos, yra reikalinga atlikti daugiau žingsnių, kad išanalizuoti rezultatus. Dažnai naudojami du NF- κ B kelio klasikiniai stimulatoriai – stiprus uždegimą sukeliantis citokinas TNF- α ir LPS, į gramneigiamų bakterijų sienelės sudėtį įeinantys komponentai. Jų signalai, nuo prisijungimo prie TNF- α receptoriaus ir TLR4 receptoriaus, atitinkamai, yra perduodami per įvairias tarpininkes molekules IKK kompleksui, kuris po to atlaisvina NF- κ B veiksnius (El-Guendy, Sinai, 2008).

Taigi, NF- κ B reporterinės sistemos (vektoriai) gali būti naudojamos stebėti NF- κ B signalinį kelią *in vitro* ląstelėse, taip pat gali būti naudojamos tirti NF- κ B kelio slopiklius ir aktyvinančius komponentus, tirti genų, susijusių su NF- κ B keliu, ekspresiją (BPS Bioscience, 2020). Neretai NF- κ B reporteriniai vektoriai yra panaudojami sukurti tam tikras ląstelių linijas, kurios toliau būtų naudojamos tirti NF- κ B kelią, analizuoti, ar jis yra įjungiamas

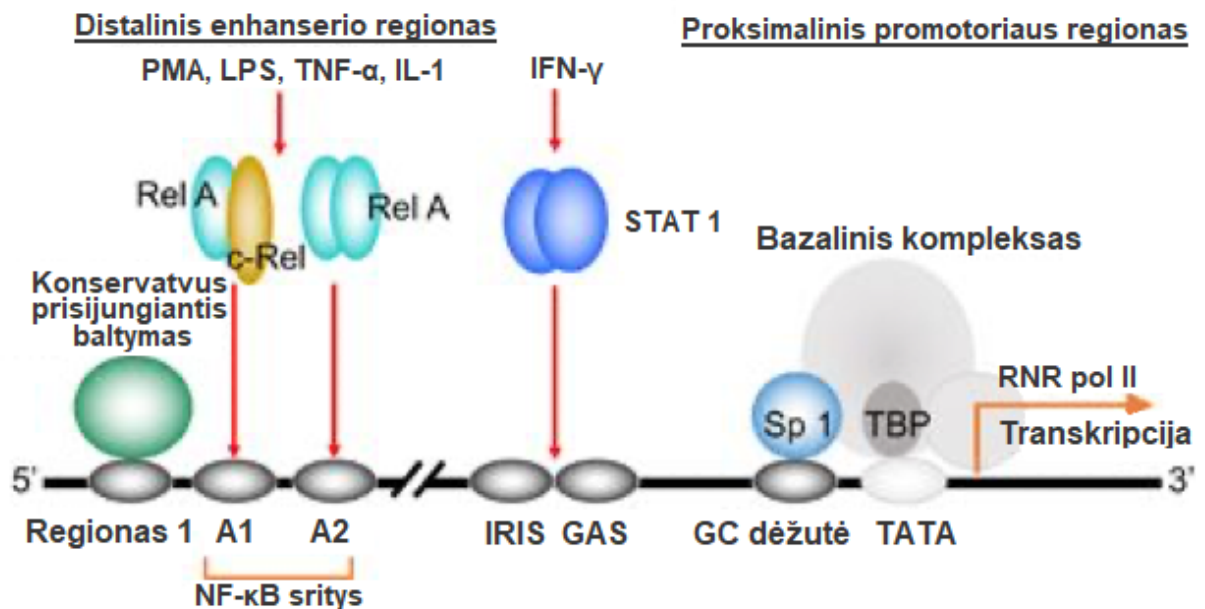
veikiant tam tikru stimulatoriumi. Yra net sukurtos ir komerciškai prieinamos stabilios ląstelių linijos, kurios ekspresuoja NF- κ B ŽFB reporterines plazmidės (Battin et al., 2017; El-Guendy, Sinai, 2008).

1.4 NF- κ B ir CCL2

CCL2 yra CC chemokino ligandas 2 (angl. *C-C Chemokine Ligand 2*), chemokinas (Nakatsumi et al., 2017). Kai kuriuose šaltiniuose įvardijamas kaip chemotaktinis citokinas. Dar žinomas kaip monocitus pritraukiantis baltymas 1, MCP-1 (Finzer et al., 2000; Bonapace et al., 2014;). Jis priklauso C-C mažų baltymų chemokinių superšeimai, kuri yra susijusi su uždegiminiais procesais ir fibrozės atsiradimu. *CCL2* yra vienas iš NF- κ B veiksmų taikinių (Fantuzzi et al., 2008). *CCL2* baltymo pagrindinė funkcija yra pritraukti kraujyje esančius monocitus, veikia chemotaksio būdu kaip cheminis dirgiklis (Kerget et al., 2019). Baltymas jungiasi prie savo CC chemokinių receptoriaus 2 (CCR2). Reguluojamas NF- κ B veiksmų, jis skatina ir makrofagų, T limfocitų, NK ląstelių kaupimąsi uždegiminiuose taškuose, tačiau juos veikia ne taip stipriai kaip monocitus. Gali taip pat aktyvuoti fibroblastus ir tada per profibrotinį mediatorių TGF- β skatinti tarpląstelinio užpildo gamybą. *CCL2* baltymas yra gaminamas įvairiose ląstelėse, įskaitant monocitus, makrofagus, epitelines ląsteles ir fibroblastus. Nesant *CCL2*, sutrinka monocitų įdarbinimas, prastėja imuninės sistemos efektyvumas prieš mikroorganizmus (Yoshimura, 2018; Silva et al., 2016; Deng et al., 2013).

CCL2 baltymo gamyba yra reguliuojama veikiant transkripcijos pradėtį. NF- κ B veiksniai yra vieni iš pagrindinių *CCL2* geno raiškos reguliavime. Šį geną sudaro du 5' šoniniai regionai: toliau esantis stipriklis (enhanseris) ir arčiau esantis promotorius. Juos skiria 2,2 kb DNR seka, kuri yra svarbi transkripcijos reguliavime. Promotoriaus/enhanserio regionai turi daug cis elementų, kurie reikalingi skirtingiems transkripcijos veiksmams. Du NF- κ B veiksmų elementai (A1 ir A2), esantys tolimesnėje regiono dalyje, yra ypač svarbūs šio geno indukcijai atsake į streso molekules, tokias kaip LPS ir TNF- α . *CCL2* kiekis ląstelėje, iš esmės, priklauso nuo NF- κ B veiksmų. Kitas gerai žinomas *CCL2* transkripcijos veiksnys – Sp1 baltymas, reguliuoja ne tik *CCL2*, bet ir kitų genų transkripciją, susijusių su uždegimu ir vėžio vystymusi, pvz.: endotelio augimo veiksnį (VEGF), uPA, jo receptorių VEGF receptorių. Sp1 kontroliuoja bazinę *CCL2* raišką, prisijungdamas prie GC dėžutės, kuri yra proksimaliniame 5' netransliuojamame geno promotoriaus regione. Tyrime nustatyta, kad esant inaktyviam Sp1 baltymui, *CCL2* raiška žymiai sumažėjo. Prie GC dėžutės gali jungtis ir NF- κ B veiksniai kartu su AP-1 veiksmiais (**1.4 pav.**) (Yoshimura, 2018; Deng et al., 2013). Geno transkripcijos valdyje dalyvauja ne tik transkripcijos veiksmams jautrus 5' regionas,

bet ir 3' regionas, esantis geno gale. Paveikus TNF- α , chromatino struktūra tampa prieinamesnė transkripcijos veiksniams, tame tarpe ir AP-1, kuris gali jungtis prie promotoriaus ir prie 3' reguliacinio regiono (Finzer et al., 2000).



1.4 pav. *CCL2* promotoriaus struktūra. Cis elementai 5' netransliuojamame regione yra susiję su geno transkripcija, prie jų jungiasi įvairūs transkripcijos veiksniai ir reguliuoja geno raišką. Sp1 jungiasi prie GX dėžutės ir reguliuoja bazinę transkripciją. NF- κ B dimerai, atsakę į stimuliaciją PMA (arba TPA), LPS, TNF- α , IL-1, jungiasi prie dviejų sričių – A1 ir A2. STAT1 homodimerai jungiasi prie GAS (esant IFN- γ stimuliacijai), šiuo atveju geno raiška priklauso nuo sąveikos tarp GAS ir IRIS, pastarasis yra raišką slopinantis elementas. Prie regiono 1 jungiasi pastovus, nežinomos funkcijos baltymas, jis būna prisijungęs ir nesant išorinei stimuliacijai (Yoshimura, 2018)

1.5 NF- κ B ir LPS

LPS (angl. *Lipopolysaccharide*) arba lipopolisacharidai, yra lipidai, kurie kovalentiškai sujungti polisacharidu. Juos įprastai sudaro trys dalys: glikano polimeras (O-lipidas), polisacharido dalis ir lipidas A (dvi gliukozamino grupės prisijungusios prie riebalų rūgščių). Lipopolisacharidai yra gramneigiamų bakterijų membranų sudedamoji dalis ir yra paleidžiami į aplinką bakterijų lizės metu (Nature, 2020). LPS būtent ir nulemia bakterijos išorinės membranos išskirtines apsaugines savybes. Jie yra gaminami citoplazmoje ir kitų baltymų pagalba perkeltami į ląstelės išorinę membraną (Owens et al., 2019). LPS žinomi kaip endotoksinai, kurie sukelia uždegiminę reakciją organizme, skatina NF- κ B kelią. Iš gramneigiamų bakterijų LPS yra išleidžiami į aplinką ir dažnai perduodami pūslelėse, kurios susidaro iš bakterijų išorinės membranos, jų sudėtyje yra dar ir kitų baltymų. Šios pūslelės

gali nukeliauti gana toli per kraują ar šlapimą nuo jų pradinės vietos (Huang, Kraus, 2016). Atėję lipopolisacharidai ir kiti bakterijų membranų komponentai ląstelėje jungiasi prie TLRs receptorių ir sukelia imuninį atsaką, tame tarpe aktyvuoja ir NF-κB veiksnius, įdarbina įvairias įgimtos imuninės sistemos ląsteles, pvz.: makrofagus, neutrofilus ir dendritines ląsteles (Xu et al., 2016). TLRs receptoriai yra daugiausiai randami imuninėse ląstelėse, ypatingai makrofaguose ir dendritinėse ląstelėse. Be šių ląstelių, jie yra dar randami ir kituose ląstelių tipuose, pvz.: endotelinėse ląstelėse, miocituose, skyd liaukės ląstelėse, endometrialinėse ląstelėse, mesangialinėse ląstelėse ir adipocituose (Garay-Malpartida et al., 2011). LPS yra pagrindinis veiksnys septinio šoko išsivystymui, kuris ištinca esant organizme perdėtai stimuliacijai. Jie pirma prisijungia prie LPS jungimosi baltymo ir yra nunešami prie ant makrofagų paviršiaus esančio CD14. Tuomet šis sąveikauja su TLR4/mieloidinio diferenciacijos baltymų kompleksu 2 (MD-2), LPS jungiasi prie receptoriaus savo lipido A dalimi (An et al., 2019). Tada TLR4 receptoriai aktyvina NF-κB kelią ir mitogenų aktyvuotą baltymų kinazės kelią, kurių dėka yra pradedami gaminti uždegimą skatinantys citokinai ir chemokinai. Žinoma, kad LPS makrofaguose skatina TNF-α, IL-1, IL-6 ir kitų uždegiminių baltymų gamybą, kurie toliau paskatina sisteminį uždegimą. Esant pertekliniam ląstelės stimuliavimui, gali būti neigiamai paveikiamas šeimininko organizmas, pažeidžiami audiniai, sutrikdomos organų funkcijos (Xu et al., 2016; Zariri et al., 2016). Taip pat nustatyta, kad esant didesnėms LPS koncentracijoms, sukeliamas žymus stresas, kuris slopina endoplazminio tinklo veiklą. Jai sutrikus įdarbinami ir NF-κB veiksniai (Babini et al., 2015). LPS gali sukelti ne tik uždegimines reakcijas, bet ir prisidėti prie nutukimo. LPS šaltiniai organizme gali būti ne tik iš išorės atkeliavusios bakterijos, bet ir šeimininko žarnyne gyvenančios vietinės, vadinamosios „gerosios“, bakterijos (Huang, Kraus, 2016). LPS ir kiti signaliniai baltymai yra plačiai naudojami tirti NF-κB kelio atsaką (Babini et al., 2015).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Medžiagos ląstelių auginimui ir jų tyrimui

Tyrimuose naudotos medžiagos ląstelių auginimui, tyrimui ir medžiagų gamintojai surašyti 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Ląstelių auginimui ir tyrimui naudoti cheminiai reagentai

Medžiagos	Gamintojas
„DMEM, high glucose, GlutaMAX™“ (Dulbecco modifikuota Eagle mitybinė terpė su padidintu gliukozės kiekiu), (Cat. No. 10566016)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV
„RPMI 1640“ („Roswell Park Memorial Institute“ centro sukurta mitybinė terpė)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV
„DPBS“ (Dulbecco fosfatinis druskų tirpalas)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV
FBS (veršelio embriono serumas)	Biochrom AG, Vokietija
„Opti-MEM“ (modifikuota „Eagle“ mitybinė terpė su sumažintu serumo kiekiu)	Gibco™, Thermo Fisher Scientific, JAV
Tripsinas	Biochrom AG, Vokietija
Transfekcijos reagentas „TurboFect™“, (Cat. No. R0534)	Thermo Fisher Scientific, JAV
LPS tirpalas „eBioscience™ Lipopolysaccharide (LPS) Solution (500X)“, (Cat. No. 00-4976-03)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, JAV
Penicilinas (antibiotikas)	Sigma-Aldrich, JAV
Streptomocinas (antibiotikas)	Sigma-Aldrich, JAV
Etanolio tirpalas >96 %	Universiteto vaistinė, Lietuva
„Trypan Blue Solution, 0,4 %“ dažas (Cat. No. 15250061)	Thermo Fisher Scientific, JAV

2.1.2 Medžiagos bakterijų auginimui

Tyrimuose naudotos medžiagos bakterijų auginimui ir medžiagų gamintojai surašyti 2.2 lentelėje.

2.2 lentelė. Bakterijų auginimui naudoti cheminiai reagentai

Medžiagos	Gamintojas
Kanamocinas (antibiotikas)	Sigma-Aldrich, JAV
LB (Luria-Bertani) mitybinės terpės milteliai „LB Broth (Lennox)“, (Cat. No. L3022)	Sigma-Aldrich, JAV
Bacto agar	Sigma-Aldrich, JAV
Agarozė	Carl ROTH, Vokietija

2.1.3 Medžiagos DNR elektroforezei

Tyrimuose naudotos medžiagos elektroforezei vykdyti ir medžiagų gamintojai surašyti

2.3 lentelėje.

2.3 lentelė. DNR elektroforezei naudoti cheminiai reagentai

Medžiagos	Gamintojas
Agarozės	Carl ROTH, Vokietija
TAE buferis, pH 8,3	Thermo Fisher Scientific, JAV
Etidžio bromidas	Thermo Fisher Scientific, JAV
DNR dažas „DNA Gel Loading Dye (6X)“, (Cat. No. R0611)	Thermo Fisher Scientific, JAV
DNR molekulinės masės standartas „O’GeneRuler Express DNA Ladder“ (Cat. No. #SM1563)	Thermo Fisher Scientific, JAV

2.1.4 Plazmidės

Naudotas pAcGFP1-1 vektorius (Clontech) koduoja žaliai fluorescuojantį baltymą AcGFP1, kilusį iš baltymo AcGFP, natūraliai gaminamo medūzos *Aequorea coerulescens*. Vektorius pAcGFP1-1 taip pat turi geną, kuris ląstelei suteikia atsparumą kanamicinui.

2.1.5 Bakterijų kamienai

Vektorinių sistemų konstravimui buvo panaudotas *Escherichia coli* DH5- α bakterijų kamienas. Jis yra sukurtas, kad padidinti transformacijos efektyvumą (Anton, Raleigh, 2016).

2.1.6 Ląstelių kultūros

HEK293T (ATCC® CRL-3216™) – ląstelių linija, išvesta iš žmogaus embrioninių inkstų 293 ląstelių linijos. Jos ekspresuoja SV40 T antigeną (ATCC, 2020). Ląstelės auginamos DMEM terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 μ g/ml streptomicino.

A549 (ATCC® CCL-185™) – žmogaus adenokarcinomos alveolių bazalinio epitelio ląstelių linija (ATCC, 2020). Ląstelės augintos DMEM terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino.

HCT 116 (ATCC® CCL-247™) – storosios žarnos karcinomos vėžio ląstelių linija. Turi mutaciją Ras protoonkogeno 13 kodone (ATCC, 2020). HCT 116^{p53⁻/p53⁺} ląstelės buvo sukurtos inaktyvius p53 baltymą – į genomą buvo įkelta shDNR (angl. *short hairpin DNA*) insertas, kuri blokavo p53 veiklą. HCT 116 shK ląstelės, į kurias buvo įkeltas shDNR (angl. *short hairpin DNA*) insertas, tačiau neblokavo p53. Pastarosios ląstelės buvo naudojamos kaip kontrolė. Visos HCT ląstelių linijos augintos RPMI terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/ml penicilino, 100 µg/ml streptomicino.

2.1.7 Kitos medžiagos

Kitos medžiagos, kurios buvo naudotos tyrime, bus nurodytos žemiau, prie metodų. Darbuose taip pat naudoti komerciniuose rinkiniuose sukomplektuoti tirpalai.

2.2 Metodai

2.2.1 Promotorių sekų analizė

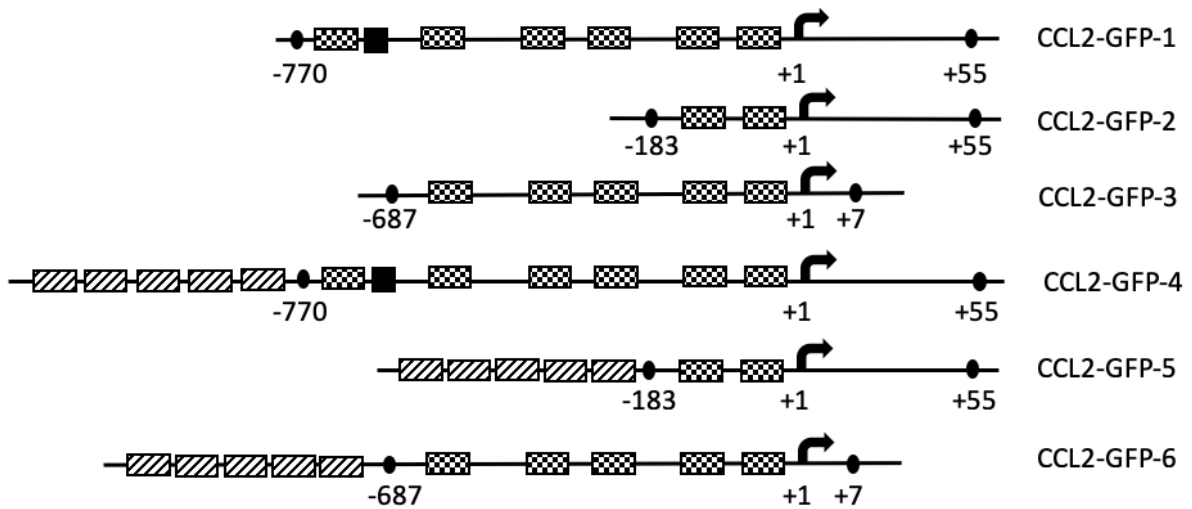
Promotorių sekų analizė buvo atlikta naudojantis internetine eukariotų promotorių duomenų baze (EPD, 2019). Buvo nustatyta tiksli *CCL2* promotoriaus seka ir pagal ją PGR metodu nuskaityti skirtingo ilgio *CCL2* promotoriaus fragmentai. *ELAM* promotoriaus seka su sintetinėmis 5xNF-κB (5xGGGACTTTCC2) sekomis buvo paimta iš pNiFty-SEAP komercinio vektoriaus (InvivoGen, JAV). Sintetinės 5xNF-κB sekos, kurios buvo naudotos sudaryti *CCL2* promotoriaus konstruktus, taip pat buvo paimtos iš pNiFty-SEAP komercinio vektoriaus.

2.2.2 DNR fragmentų su *CCL2*, *ELAM* promotoriais ir NF-κB sekomis paruošimas

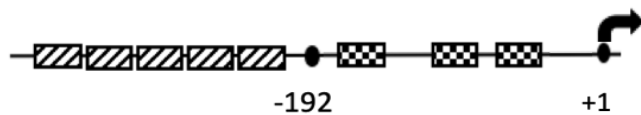
Sintetinės NF-κB sekos buvo sukurtos genų sintezės būdu (Eurofins Scientific). Šeši skirtingi *CCL2* promotoriaus sekų variantai: CCL2-GFP-1 (6 endogeninės NF-κB sekos), CCL2-GFP-2 (2 endogeninės NF-κB sekos), CCL2-GFP-3 (5 endogeninės NF-κB sekos), CCL2-GFP-4 (5 sintetinės ir 6 endogeninės NF-κB sekos), CCL2-GFP-5 (5 sintetinės ir 2 endogeninės NF-κB sekos), CCL2-GFP-6 (5 sintetinės ir 5 endogeninės NF-κB sekos); buvo padauginti PGR metodu, panaudojant žmogaus mikroglijos ląsteles. Promotorių sekų

struktūros pateikiamos **2.1 pav.** DNR seka su *ELAM* promotoriumi ir penkiomis sintetinėmis NF-κB sekomis buvo padauginta taip pat naudojant PGR metodą, čia kaip pagrindas naudotas pNiFty-SEAP vektorius (InvivoGen, JAV). Sekos struktūra atvaizduota **2.2 pav.** Pradmenų sekos, naudotos DNR fragmentų su *CCL2*, *ELAM* promotoriais ir NF-κB sekomis padauginimui PGR metodu, pateikiamos **PRIEDŲ 1 lentelėje**.

PGR reakcijai naudojama: 5× „Phusion High-Fidelity” DNR polimerazė, „Phusion GC” buferis, dNTP (Thermo Fisher Scientific) (**2.4 lentelė**). PGR metodas vykdomas „Labcycler“ termocikleryje (SensoQuest GmbH, Vokietija) pagal programą (**2.5 lentelė**). Po to PGR rezultatai buvo patikrinti vykdant elektroforezę.



2.1 pav. Šešių *CCL2* promotoriaus konstruktų struktūrų schemas. Taškuotos dėžutės atitinka endogenines NF-κB sekas, brūkšniuotos dėžutės – sintetines NF-κB sekas, juodi ovalai – promotoriaus sekos ribas, juodos dėžutės – numanomus TATA kontrolės elementus, rodyklė parodo transkripcijos pradžią. Promotorių schemas pavaizduotos neišlaikant tikrojo mastelio



2.2 pav. DNR fragmento su 5xNF-κB ir *ELAM* promotoriumi struktūros schema. Taškuotos dėžutės atitinka endogenines NF-κB sekas, brūkšniuotos dėžutės – sintetines NF-κB sekas, juodi ovalai – promotoriaus sekos ribas, rodyklė parodo transkripcijos pradžią. Promotoriaus schema pavaizduota neišlaikant tikrojo mastelio

2.4 lentelė. PGR mišinio komponentai ir jų kiekiai

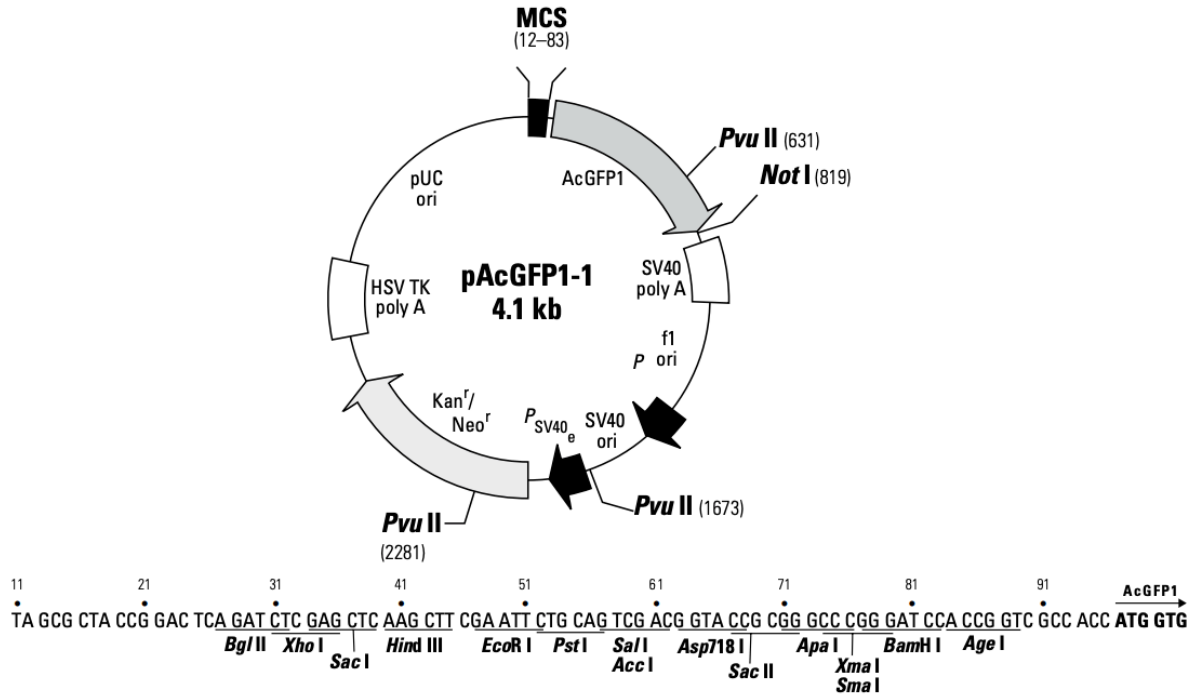
PGR reakcijos mišinys vienam DNR mėginiui	
Medžiaga	Galutinė koncentracija mėgintuvėlyje
Sterilus dejonizuotas vanduo	iki 20 μ l
5 \times „Phusion GC“ buferis	1 \times
10 mM dNTP mišinys	1 mM
Pradmenys (tiesioginis ir atvirkštinis)	10 μ M + 10 μ M
„Phusion High-Fidelity“ polimerazė	1U
DNR	0,125 μ g

2.5 lentelė. PGR sąlygos DNR fragmentų su *CCL2* promotoriumi

PGR programa	
95 °C – 5 min.	1 ciklas
95 °C – 45 sek.	29 ciklai
60 °C – 45 sek.	
72 °C – 45 sek.	
72 °C – 10 min.	1 ciklas
4 °C	∞

2.2.3 Vektorių konstravimas

Reporterinėms sistemoms sukurti naudotas pAcGFP1-1 vektorius (2.3 pav.). Kad sukirpti plazmidės ir paruošti ligavimo reakcijai, buvo naudojama: 10 \times „FastDigest“ buferis, DNR, „FastDigest“ restrikcijos endonukleazės (RE), „FastAP“ (Thermo Fisher Scientific) ir sterilus dejonizuotas H₂O (PRIEDŲ 2 lentelė). Taip pat buvo sukirpti ir keturi DNR fragmentai su NF- κ B atsako promotoriaus sekomis: 5xNF- κ B-ELAM, CCL2-GFP-3, CCL2-GFP-5, CCL2-GFP-6. Tam naudoti tokie patys reagentai kaip ir plazmidės karpymui, jų kiekiai surašyti PRIEDŲ 3 lentelėje. Plazmidėms ir NF- κ B atsako promotoriaus sekoms sukirpti panaudotos RE surašytos 2.6 lentelėje. Sumaišius reagentus, mėgintuvėliai su plazmidėmis ir NF- κ B atsako promotoriaus sekomis paliekami 2 val. 37°C temperatūroje. Tada vykdoma šių DNR fragmentų elektroforezė agarozės gelyje. Po elektroforezės perkirpta plazmidė ir NF- κ B atsako promotoriaus sekos iš gelio išgryninamos su „GeneJet Gel Extraction Kit“ (Thermo Fisher Scientific, JAV) rinkiniu, vadovaujantis gamintojo protokolu.



2.3 pav. Vektoriaus pAcGFP1-1 schema su MCS – daugybinio įklonavimo srities (angl. *Multiple Cloning Site*) seka. MCS sekoje ir vektoriaus schemoje juodai paryškinti RE pavadinimai, pažymėta jų kirpimo vieta sekose (Takara Bio, 2020)

2.6 lentelė. Plazmidinei ir NF-κB atsako promotoriaus DNR sekoms sukirti panaudotos RE

DNR sekos	Pirma RE	Antra RE
pAcGFP1-1 vektorius ir CCL2-GFP-3 seka	KpnI	BamHI
pAcGFP1-1 vektorius ir CCL2-GFP-5 seka	KpnI	BamHI
pAcGFP1-1 vektorius ir CCL2-GFP-6 seka	XhoI	BamHI
pAcGFP1-1 vektorius ir 5xNF-κB-ELAM seka	EcoRI	BamHI

Toliau buvo vykdoma ligavimo reakcija. Į mėgintuvėlį buvo įpilama sukirpto 100 ng vektoriaus, DNR fragmento su NF-κB atsako promotoriumi (jo atitinkamas kiekis paskaičiuojamas naudojantis „NEB“ tinklapio skaičiuokle, kad vektoriaus ir promotoriaus sekos būtų santykis 1:5), 1 μl 10× T4 DNR ligavimo buferio, 1 μl T4 DNR ligazės (Thermo Fisher Scientific) ir sterilaus dejonizuoto vandens iki 10 μl. Reakcijos mišinys paliekamas 16 °C temperatūroje per naktį. Buvo sukonstruoti: pAcGFP-5xNF-κB-ELAM (teigiama kontrolė), kuris turėjo įterptą 5xNF-κB-ELAM promotoriaus konstrukta, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 turėjo CCL2-GFP-6 promotoriaus konstrukta, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 – CCL2-GFP-5, o pAcGFP-CCL2-1 – CCL2-GFP-3.

2.2.4 *E. coli* kompetentinių ląstelių paruošimas

E. coli DH5- α bakterijų kamienas užsėjamas į 50 ml mėgintuvėlį su 5 ml LB mitybine terpe, paliekama augti 37 °C. 1 ml bakterijų kultūros perkeliama į kolbą su 100 ml LB terpe per naktį augti 37 °C temperatūroje purtyklėje. Ji kultivuojama 37 °C purtyklėje iki kol OD600 (optinis tankis, matuojant 600 nm ilgio bangomis) pasiekia 0,4-0,5 įvertį. Tada ląstelių kultūra šaldoma lede 10 min. ir po to perkeliama į atšaldytus mėgintuvėlius. Ląstelės surenkamos jas centrifuguojant 5000×g 3 min. Skystis nusiurbiamas ir bakterijos švelniai papipetuojamos užpylus 20 ml lede atšaldytos 0,1 M CaCl₂ terpės, nepurtant. Tuomet dedamos 20 min. į ledą. Bakterijų kultūros vėl nucentrifuguojamos 5000×g 3 min., o atsiskyręs skystis nusiurbiamas. Po to užpilama 0,5 ml šalto 0,1 M CaCl₂/15 % glicerolio tirpalo. Mišinys su bakterijomis išpilstomas į mėgintuvėlius po 50 μ l ir šie padedami laikyti -80 °C temperatūroje.

2.2.5 Transformacija

Kad padauginti sukonstruotas reporterines sistemas, buvo panaudotos kompetentinės *E. coli* ląstelės. Jos buvo atšildomos lede ir jame paliekamos dar 10 min. Į vieną mėgintuvėlį su kompetentinėmis bakterijomis įdedama ligavimo produkto 10 μ l, į kitą, atitinkantį teigiamą kontrolę, 1 μ l nekirpto pAcEGF 1-1 vektoriaus (5 ng/ μ l koncentracijos), o trečias – neigiama kontrolė, paliekamas tik su bakterijomis. Tada mėgintuvėliai inkubuojami lede 30 min., po to laikomi 30 sek. 42 °C termomikseryje, purtant 550 rpm. Mėgintuvėliai įdedami į ledą ir laikomi 5 min. Tada į mėgintuvėlius įdedama 950 μ l LB mitybinės terpės be antibiotikų ir paliekama laikyti 1 val. 37 °C temperatūros termomikseryje. 100 μ l mišinio su bakterijomis užsėjama ant lėkštelių su LB terpe ir antibiotiku kanamicinu. Ląstelės auginamos 37 °C temperatūroje per naktį. Kitą dieną stebimos išaugusios kolonijos.

2.2.6 Plazmidinės DNR gryninimas

Plazmidinei DNR išskirti buvo naudojamas „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkinys (Thermo Fisher Scientific, Lietuva). *E. coli* bakterijos yra užsėjamos į 15 ml mėgintuvėlį su 5 ml LB mitybinės terpės ir kanamicino mišiniu. Paliekama inkubuotis 37 °C temperatūroje purtyklėje per naktį. Po to ląstelių kolonijos centrifuguojamos 3000×g jėga 5 min. Toliau vykdyti etapai pagal gamintojo protokolą. Galiausiai išskirtos plazmidinės DNR kiekis ir grynumas yra išmatuojamas, naudojant spektrofotometrą „Nanodrop 2000“ (Thermo Fisher

Scientific, JAV), matuojamas optinis tankis ($\lambda = 260 \text{ nm}$) ir DNR grynumas įvertinamas nustatant A260/280 ir A260/230 santykius. Plazmidinė DNR laikoma $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūroje.

2.2.7 Konstruktų patikrinimas restrikcine analize

Norint patikrinti, ar pavyko vektoriaus ligavimo reakcija, plazmidės, išskirtos iš *E. coli* bakterijų, karpomos restrikcijos endonukleazėmis. Karpymui naudotos „FastDigest“ restrikcijos endonukleazės (Thermo Fisher Scientific). Reakcijai vykdyta į mėgintuvėlį įdedant po $0,5 \mu\text{l}$ kiekvieno iš RE fermentų, 100 ng DNR, $3 \mu\text{l}$ $10\times$ „FastDigest“ buferio ir sterilaus dejonizuoto H_2O iki $30 \mu\text{l}$ bendro tūrio. Paliekama reakcija vykti $37 \text{ }^\circ\text{C}$ per naktį.

2.2.8 DNR elektroforezė

DNR elektroforezei naudojamas 1% agarozės gelis, paruoštas naudojant $1\times$ TAE buferį, DNR fragmentų išryškinimui naudotas $0,05\text{-}0,1 \text{ mg/ml}$ EtBr. Metode naudotas DNR molekulinės masės standartas „O’GeneRuler Express DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, JAV). Gelių vizualizacija vykdyta naudojant „MiniBIS Pro“ vizualizacijos sistemą (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izraelis).

2.2.9 Ląstelių auginimas

HEK293T, A549, HCT 116, HCT 116- $p53^{-/-}$ ir HCT 116 shK ląstelės kultivuotos 25 cm^2 kolbelėse (angl. *flasks*) su 5 ml mitybinės terpės: HEK293T ir A549 atveju su DMEM (su papildintu gliukozės kiekiu), HCT 116, HCT 116- $p53^{-/-}$ ir HCT 116 shK su RPMI. Į šias mitybines terpes dar papildomai pridėta 10% FBS, 100 U/ml penicilino, $100 \mu\text{g/ml}$ streptomicino. Ląstelių kultūros buvo persėjamos, kai ląstelių monosluoksnis kolbelėje pasiekdavo apie apie $80\text{-}90 \%$ jos ploto. Tada pipete nusiurbiamo mitybinė terpė, ląstelės praplaunamos 5 ml PBS tirpalu, jos atkeliamos, užpilant $200 \mu\text{l}$ $0,25 \%$ tripsino- $0,02 \text{ mM}$ EDTA tirpalu. Kai ląstelės atkimba nuo kolbelės dugno, jose esantis tripsinas neutralizuojamas 5 ml mitybinės terpės su 10% FBS. Ląstelės suspenduojamos ir išpilstomos į naujas 25 cm^2 kolbeles, ląstelių ir mitybinės terpės santykiu $1:5$. Taip jos paliekamos tolesniam auginimui. Ląstelės patalpinamos į $37 \text{ }^\circ\text{C}$ termostatą su 5% CO_2 atmosferoje. Ląstelių augimas stebimas invertuotu optiniu mikroskopu „Nikon TS 100-F“ (Nikon, Japonija).

2.2.10 Ląstelių skaičiavimas

Ląstelių skaičiavimas vykdomas ląsteles paveikiant tripsino ir EDTA tirpalu ir suspenduojant nustatytame mitybinės terpės tūryje (V). 10 μ l ląstelių suspensija, sumaišyta su „Trypan Blue Solution, 0.4%“ dažu (santykiu 1:1), užpilama ant devynių kvadratų skaičiavimo gardelės mikroskopinio stikliuko (Immune Systems Ltd., JK). Invertuoto optinio mikroskopo pagalba nustatomas vidutinis ląstelių skaičius (N_{vid}), tenkantis vienam gardelės sektoriui. Bendras ląstelių skaičius pradinėje suspensijoje apskaičiuojamas pagal formulę:

$$N = N_{vid} \times \text{skiedimo faktorius} \times 10^4;$$

čia N – ląstelių skaičius pradinės suspensijos 1 ml; N_{vid} – vidutinis ląstelių skaičius gardelės sektoriuje; 10^4 – gardelės konstanta.

2.2.11 Ląstelių transfekcija ir fluorescencinė mikroskopija

24 val. prieš transfekciją, ląstelės užsėjamos 24 šulinėlių plokštelėse po 1 ml suspensijos ($5 \cdot 10^5$ ląstelių vienam šulinėliui). Prieš vykdant transfekciją ląstelės monosluoksniu turi būti padengę 70-80% šulinėlio ploto. Į mėgintuvėlį įpilama 210 μ l terpės be serumo Opti-MEM, 2 μ g plazmidinės DNR (kiekis dviem šulinėliams), atsargiai išmaišoma. Tada įlašinamas 5,6 μ l „TurboFect“ transfekcijos reagentas (Thermo Fisher Scientific), švelniai išmaišoma ir inkubuojama 15-20 min kambario temperatūroje. Po to 100 μ l atitinkamo mišinio sulašinama į kiekvieną šulinėlį. Ląstelės su transfekcijos mišiniu inkubuojamos 6-7 val. 37 °C termostate su 5 % CO₂ atmosferoje. Praėjus 6-7 valandoms terpė nuo ląstelių pipete nusiurbiamą ir užpilama 1 ml šviežios auginimo terpės ir pusė šulinėlių su tuo pačiu vektoriumi paveikiami 1 μ g LPS.

Iš atliktų 4 transfekcijų, 2 su HEK293T ir 2 su A549 ląstelėmis, ŽFB raiška buvo stebima fluorescenciniu mikroskopu „Nikon Eclipse 50i“ (Nikon, Japonija). Rezultatai stebimi praėjus 24, 48 ir 72 val. po transfekcijos. Buvo vaizdinamos ir išsaugomos fluorescencinės nuotraukos, padarytos iš kiekvieno transfekuotų ląstelių ploštelės šulinėlio (po 3 nuotraukas vienam šulinėliui).

2.2.12 Rezultatų analizė

Kad teoriškai paskaičiuoti, kokie bus fragmentai, juos sukarpius įvairiomis restrikcijomis endonukleazėmis, naudota „SnapGene Viewer“ (NIH, JAV) programa. Norint išanalizuoti paveikslus, padarytus su fluorescenciniu mikroskopu, buvo naudota „ImageJ“ (NIH, JAV) programa. Iš fluorescencinių nuotraukų nustatyta suminė ŽFB ekspresija (SŽE)

santykiniais vienetais (svnt). Nuotraukose buvo įvertintas kiekvienos ekspresuojančios ŽFB ląstelės plotas ir MG_V (angl. *Mean Gray Value*) rodiklis, jų sandauga nulėmė suminę ŽFB ekspresiją.

2.2.13 Statistinė analizė

Statistiniams skaičiavimams ir diagramų sudarymui buvo naudota „Microsoft Excel“ (Microsoft, JAV) programa. Su ja buvo paskaičiuotas SŽE vidurkis ir standartinis nuokrypis. „GraphPad Prism 7“ (GraphPad Software, Inc., JAV) programa buvo lyginami požymiai tarp ląstelių grupių, paveiktų skirtingomis sąlygomis, tam pritaikytas tikslusis Fišerio testas (angl. Fisher's exact test).

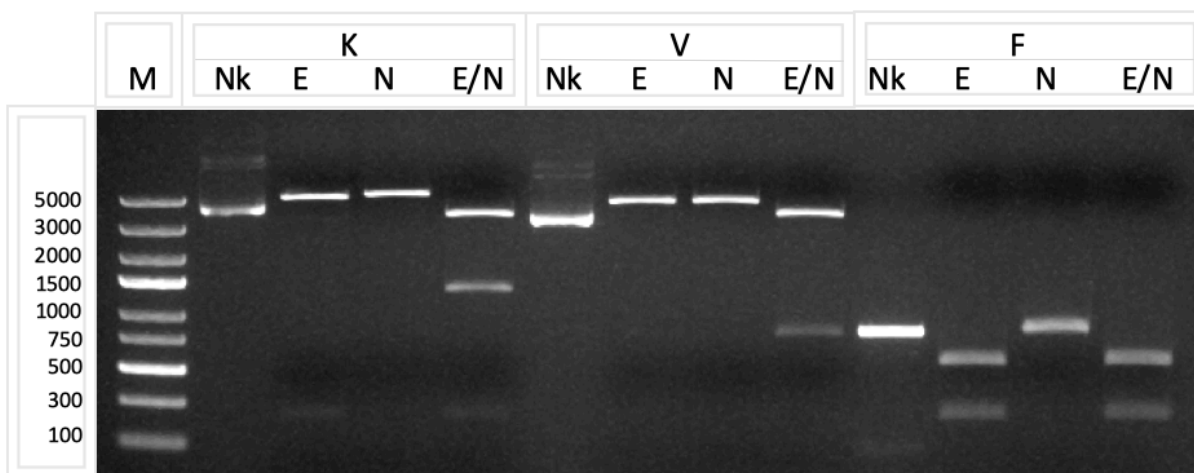
3. REZULTATAI

3.1 Sukonstruotos reporterinės sistemos ir jų struktūros analizė

Buvo sukonstruotos keturios reporterinės sistemos, naudojant komercinį bepromotorinį pAcGFP1-1 vektorių. Trys sistemos buvo sukurtos *CCL2* promotoriaus pagrindu: pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 (turinti 5 endogenines ir 5 sintetines NF-κB prisijungimo sekas, ~4,700 kb ilgio), pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 (turinti 2 endogenines ir 5 sintetines NF-κB prisijungimo sekas, ~4,3 kb) ir pAcGFP-CCL2-1 (5 endogenines NF-κB prisijungimo sekas, ~4,7 kb); ir viena *ELAM* promotoriaus pagrindu: pAcGFP-5xNF-κB-ELAM (turinti 3 endogenines ir 5 sintetines NF-κB prisijungimo sekas, ~4,4 kb). pAcGFP-5xNF-κB-ELAM sistema sukonstruota norint patikrinti vektorių veikimą (atlikti teigiamą kontrolę).

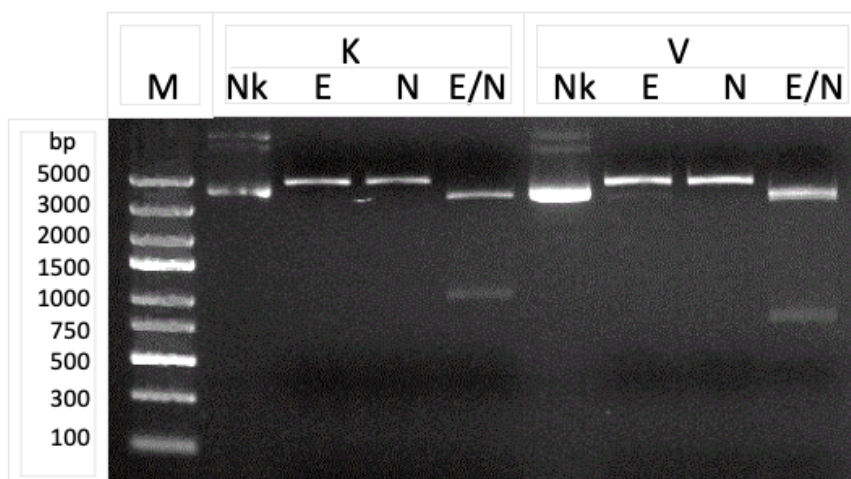
Reporterinės sistemos buvo sėkmingai padaugintos naudojantis *E. coli* bakterijomis. Tam buvo panaudotas transformacijos metodas. Bakterijos, kurios turėjo sėkmingai susiligavusius vektorius, išgyveno ir suformavo kolonijas ant Petri lėkštelių su LB agaru ir kanamicinu.

Kad patikrinti, ar į pAcGFP1-1 vektorių teisingai įsistatė NF-κB atsako promotoriaus konstruktai, iš bakterijų išskirtos plazmidės buvo karpytos su restrikcijos endonukleazėmis. Paveikus vektorinę sistemą pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 (~4,7 kb) EcoRI ir NotI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos reakcija vizualizuota elektroforezės agarozės gelyje, pavyzdys pateiktas **3.1 pav.** Gauti ~3,1 kb, ~1,3 kb ir virš 200 bp DNR fragmentai (**3.1 pav.**, K-E/N takelis). Sukarpius nemodifikuotą pAcGFP1-1 vektorių (~4,15 kb) abejomis RE, gauti 3,379 kb ir 771 bp DNR fragmentai (**3.1 pav.**, V-E/N takelis). DNR fragmentas su 5xNF-κB ir *CCL2* promotoriumi taip pat buvo karpytas su RE, gauti virš 500 bp ir virš 100 bp fragmentai (**3.1 pav.**, F-E/N takelis). Atlikti praktiniai rezultatai atitiko teoriškai paskaičiuotus – vektoriniai konstruktai buvo virtualiai sukirpti naudojantis „SnapGene Viewer“ programa.



3.1 pav. Agarozės gelio elektroforezės nuotrauka. M – molekulinės masės žymuo „O³GeneRuler Express DNA Ladder“, K – pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1, V – vektorius pAcGFP1-1, F – fragmentas su 5xNF-κB ir *CCL2* promotoriaus sekomis, Nk - nekarpyta, E - kirpta EcoRI, N - kirpta NotI, E/N - kirpta EcoRI ir NotI

Norint patikrinti pAcGFP-5xNF-κB-ELAM reporterinės sistemos struktūrą, ji buvo karpyta taip pat su EcoRI ir NotI restrikcijos endonukleazėmis. Restrikcijos reakcija buvo taip pat patikrinta vykdant elektroforezę agarozės gelyje, nuotraukos pvz. pateiktas **3.2 pav.** Sukarpius apie 4,4 kb vektorinę sistemą abejomis RE, buvo gauti ~3,4 kb, ~1 kb DNR fragmentai (**3.2 pav.**, K-E/N takelis) Nemodifikuotą pAcGFP1-1 (~4,15 kb) perkirpus abejomis RE, taip pat gauti 3,379 kb ir 771 bp DNR fragmentai (**3.2 pav.**, V-E/N takelis). Kaip ir anksčiau minėtos reporterinės sistemos, taip ir šiuo atveju gauti rezultatai atitiko teoriškai paskaičiuotus, kurie buvo gauti naudojantis „SnapGene Viewer“ programa.

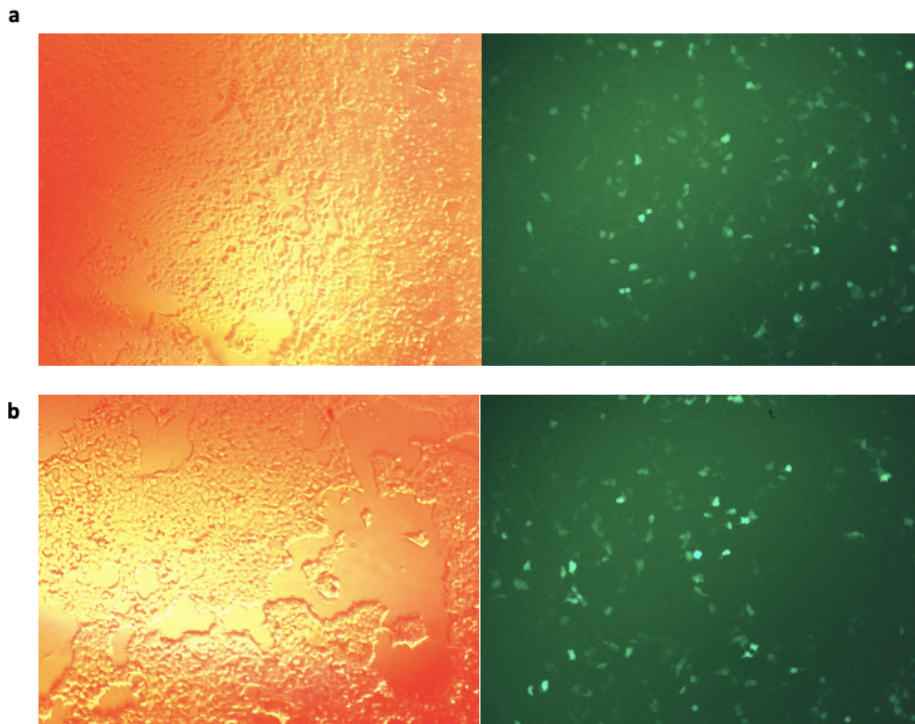


3.2 pav. Agarozės gelio elektroforezės nuotrauka. M – molekulinės masės žymuo *GeneRuler™ Express DNA Ladder*, K – plazmidė pAcGFP-5xNF-κB-ELAM, V – vektorius pAcGFP1-1, Nk - nekarpyta, E - kirpta EcoRI, N - kirpta NotI, E/N - kirpta EcoRI ir NotI

3.2 Reporterinių sistemų efektyvumo analizė

Kad nustatyti, kaip veikia sukurtos NF- κ B reporterinės sistemos, jos buvo transfekuotos į HEK293T ir A549 ląstelių linijas. Tada jos buvo paveiktos LPS endotoksinais, kurie aktyvina NF- κ B veiksnius ir po to buvo stebima reporterinio geno produkto – žaliai fluorescuojančio baltymo (ŽFB), raiška. ŽFB ekspresija, šiuo atveju, reguliuojama NF- κ B veiksnų, prisijungusių prie *CCL2* ar *ELAM* promotoriaus sekoje esančių endogeninių arba prieš jį einančių sintetinių NF- κ B veiksniams specifinių sekų. Ląstelių linija HEK293T transfekuota pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1 ir pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2, pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM vektorinėmis sistemomis, o A549 ląstelės - pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1, pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 ir pAcGFP-CCL2-1, pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM vektorinėmis sistemomis. Kadangi, apšvietus 475 nm ilgio bangomis, ŽFB pasižymi fluorescencija, šio baltymo raiškai stebėti naudotas fluorescencinis mikroskopas. Analizuojant vaizdinimo metu padarytas nuotraukas, naudojantis „ImageJ“ (NIH, JAV) programa, buvo apskaičiuota suminė ŽFB ekspresija (SŽE).

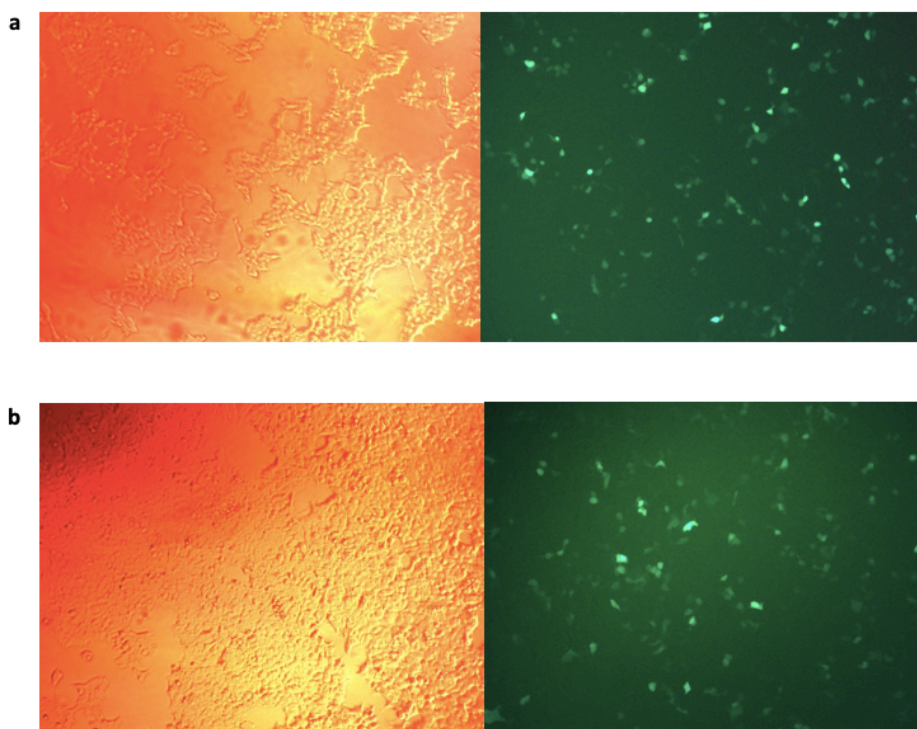
HEK293T atveju ŽFB raiška buvo stebima po 24 val. Šis laiko tarpas po transfekcijos buvo pasirinktas remiantis laboratorijoje gautais duomenimis, patvirtinančias jog HEK293T ląstelėse ŽFB raiška, praėjus 24 valandoms po transfekcijos, jau pasiekia maksimalias reikšmes. Vizualiai nebuvo ryškaus skirtumo tarp ląstelių paveiktų LPS ir nepaveiktų, pvz., pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 atveju **3.3 pav.** (pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1 atvejis **PRIEDŲ 1 pav.**) Paskaičiavus nustatyta kad, HEK293T LPS- ląstelių, visų reporterinių sistemų atveju, suminė ŽFB ekspresija buvo didesnė, lyginant su paveiktomis LPS ląstelėmis. pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1 LPS+ atveju SŽE siekė $\sim 157 \pm 6,7$, o LPS- atveju $\sim 164 \pm 4,4$ santykinųjų vienetų (svnt). Vektoriaus pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 LPS+ atveju SŽE buvo apie $160 \pm 9,3$, LPS- – apie $180 \pm 8,4$ svnt. Tačiau šie skirtumai nebuvo statistiškai reikšmingi.



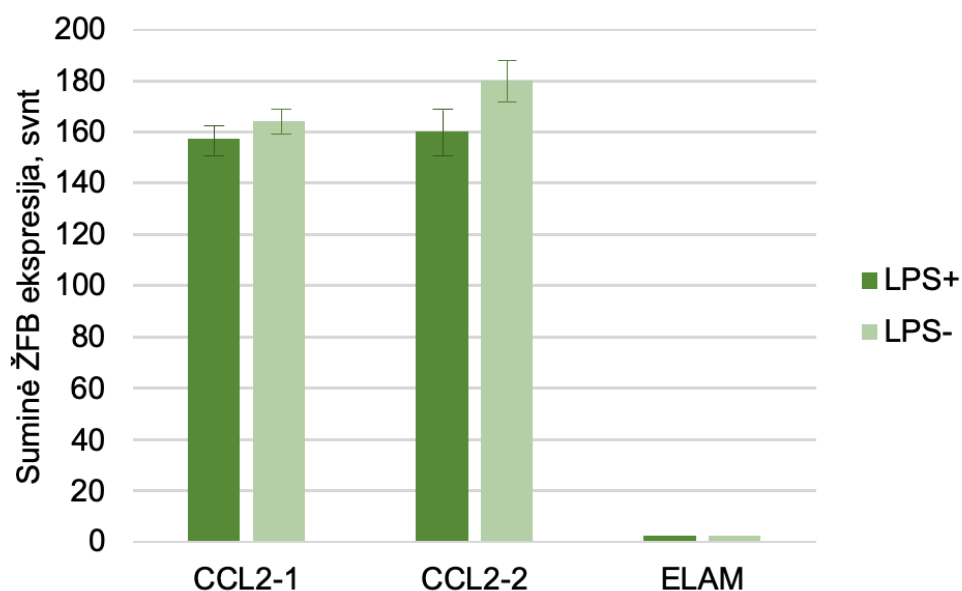
3.3 pav. ŽFB baltymo ekspresija HEK293T ląstelėse, praėjus 24 val. po transfekcijos. Ląstelės transfekuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterine sistema. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – nepaveiktos LPS ląstelės, B – paveiktos LPS ląstelės

Vertinant HEK293T ląsteles, transfekuotas su pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 ir su pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 vektoriais, suminė ŽFB ekspresija tarp vektorinių sistemų vizualiai labai nesiskyrė (**3.4 pav.**). Paskaičiavus ir palyginus, nustatyta, kad visgi buvo šiek tiek didesnė ŽFB raiška ląstelių, turinčių pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterinę sistemą, tačiau raiškos skirtumas tarp abiejų reporterinių sistemų nebuvo statistiškai patikimas. Nesant LPS stimuliacijai, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterinės sistemos SŽE siekė apie $180 \pm 8,4$, o pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 – $164 \pm 4,4$ svnt.

Transfekavus pAcGFP-5xNF-κB-ELAM sistema ir nustatius ŽFB baltymo raišką po 24 val., buvo pastebėta, kad ląstelėse baltymas buvo beveik neekspresuojamas, palyginus su kitomis vektorinėmis sistemomis (**PRIEDU 2 pav.**). Apibendrintai suminė ŽFB ekspresija tarp trijų vektorinių sistemų, esant ir nesant poveikiu LPS, atvaizduota diagramoje **3.5 pav.**



3.4 pav. ŽFB baltymo ekspresija HEK293T ląstelėse, praėjus 24 val. po transfekcijos. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – transfektuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 vektoriumi, B – pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 vektoriumi

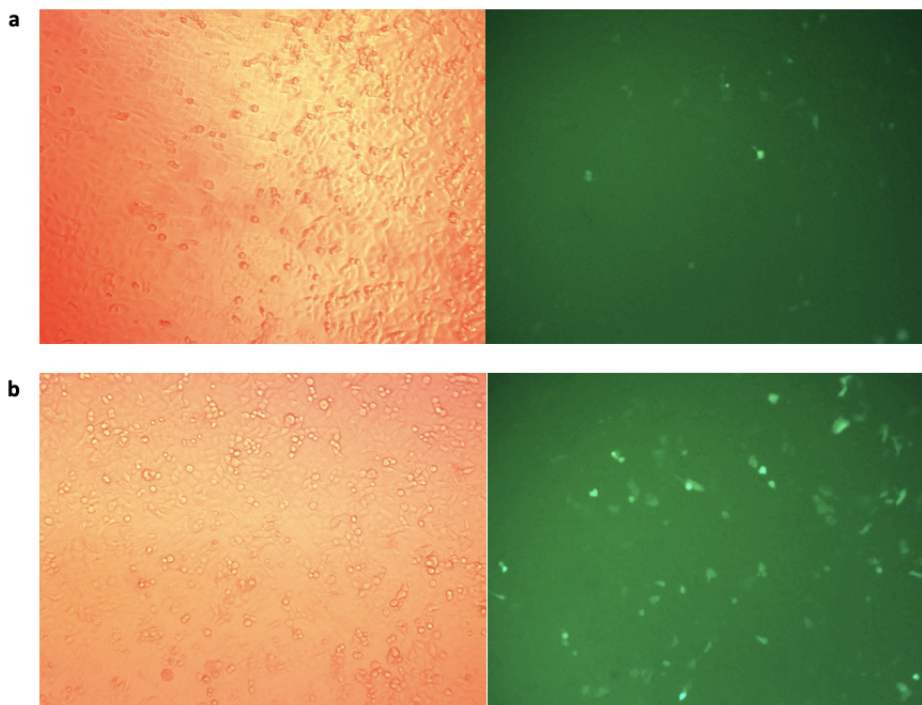


3.5 pav. Suminė ŽFB ekspresija HEK293T ląstelėse, transfektuotose trejomis vektorinėmis sistemomis, esant ir nesant stimuliacijai LPS. CCL2-1 atitinka pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 vektorių, CCL2-2 – pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2, ELAM – pAcGFP-5xNF-κB-ELAM reporterines sistemas, $p > 0,05$

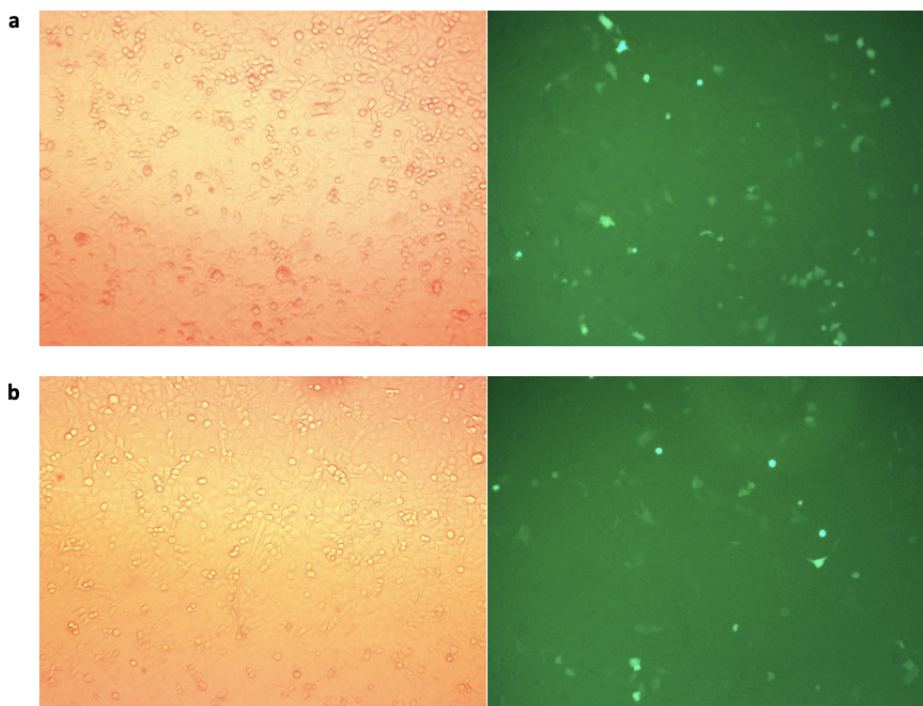
A549 ląstelių atveju žaliai fluorescuojančio baltymo raiška buvo stebima po 24, 48 ir 72 val. Didžiausia ŽFB baltymo ekspresija buvo nustatyta praėjus 72 val. po transfekcijos (3.6

pav.) pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 LPS+ atveju, praėjus 24 val., SŽE siekė apie $15 \pm 2,1$ svnt, o praėjus 72 val. – apie $126 \pm 4,7$ svnt. Taigi, baltymo raiška padidėjo daugiau nei 8 kartus. Pavyzdys praėjus 24 ir 48 val. po transfekcijos pateiktas **PRIEDŲ 3 pav.**

Esant ir nesant poveikiui LPS, ŽFB raiška vizualiai labai nesiskyrė tarp ląstelių, transfekuotų pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1, pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 ir pAcGFP-CCL2-1 reporterinėmis sistemomis (**3.7 pav.**, **PRIEDŲ 4 pav.**, **5 pav.**). Tačiau paskaičiavus su „ImageJ“ programa nustatyta, kad suminė ŽFB ekspresija po 72 val. buvo šiek tiek didesnė esant poveikiu LPS, lyginant su nepaveiktomis LPS A549 ląstelėmis. pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1 LPS+ atveju SŽE buvo $\sim 105 \pm 8,6$, LPS- – apie $97 \pm 4,3$ svnt. pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 esant LPS+ SŽE siekė $\sim 126 \pm 4,7$, o LPS- – apie $123 \pm 8,3$ svnt. Vektoriaus pAcGFP-CCL2-1 LPS+ atveju SŽE siekė $\sim 93 \pm 4,1$, o LPS- – apie $91 \pm 3,6$ svnt.



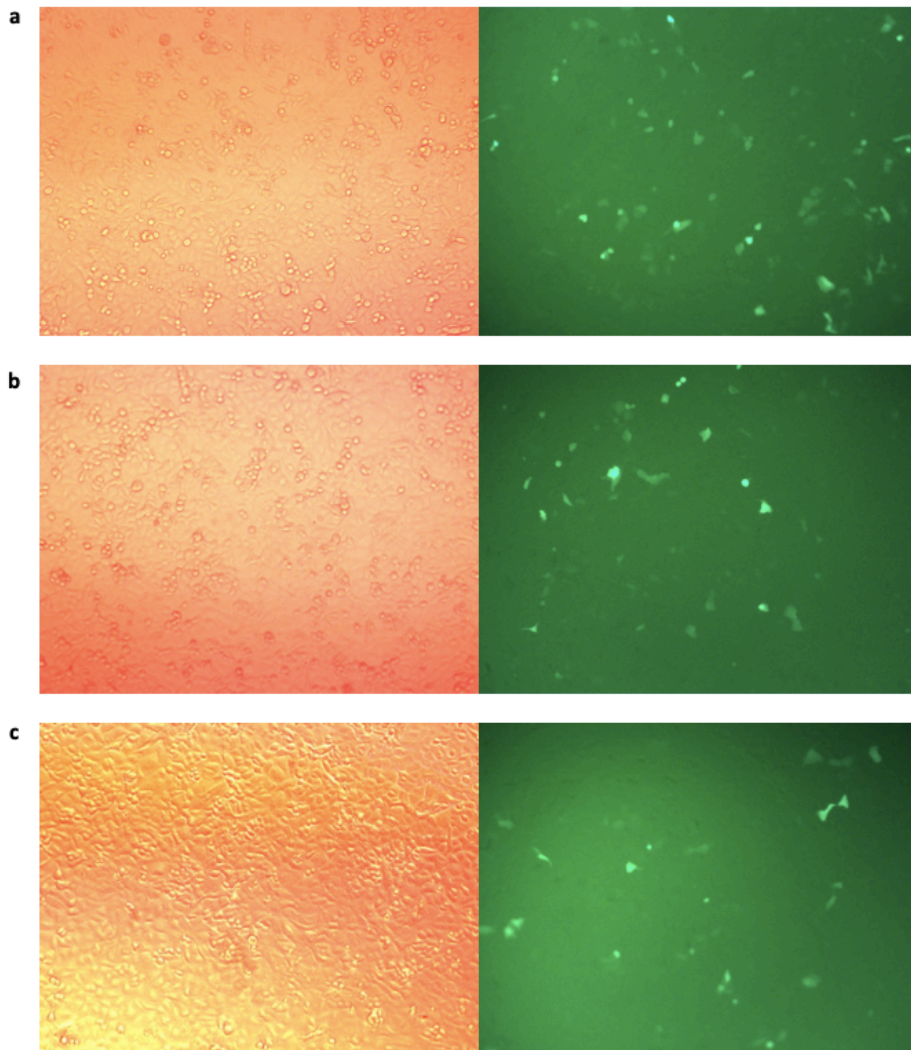
3.6 pav. ŽFB baltymo ekspresija A549 ląstelėse, transfekuotose pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 vektoriumi, paveikus LPS. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – praėjus 24 val. po transfekcijos, B – praėjus 72 val. po transfekcijos



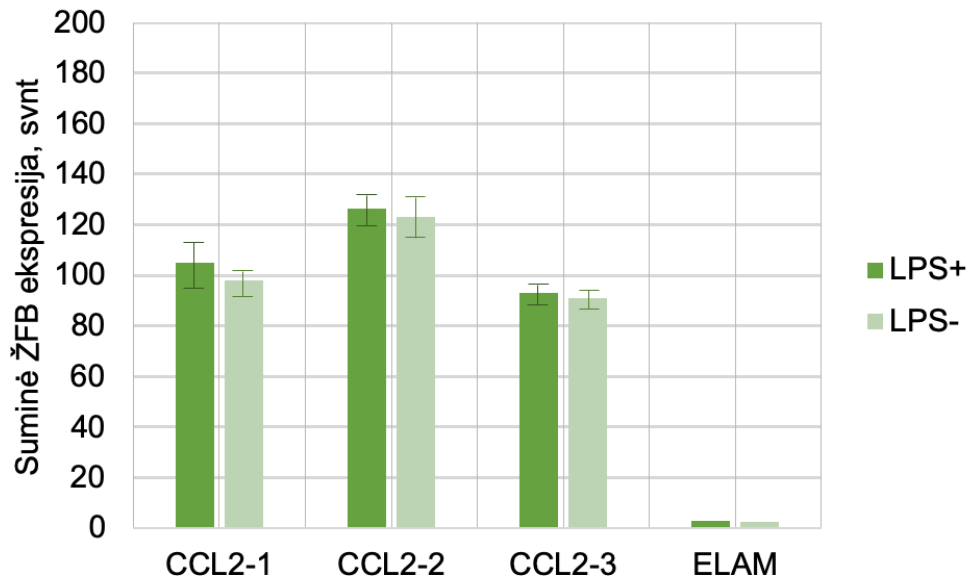
3.7 pav. ŽFB baltymo ekspresija A549 ląstelėse, transfekuotose pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 vektoriumi, 72 val. po transfekcijos. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – paveiktos LPS ląstelės, B – nepaveiktos LPS ląstelės

Taip pat buvo palygintos tarpusavyje A549 ląstelės, transfekuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 ir pAcGFP-CCL2-1 reporterinėmis sistemomis. Suminė ŽFB ekspresija po 72 val. taip pat, kaip ir HEK293T atveju, buvo šiek tiek didesnė tų ląstelių, kurios buvo transfekuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterine sistema (**3.8 pav.**). LPS+ atveju ji siekė apie $126 \pm 4,7$ svnt. Tuo tarpu pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 ir pAcGFP-CCL2-1 sistemų atveju SŽE siekė atitinkamai $105 \pm 8,6$ ir $93 \pm 4,1$ svnt.

A549 ląstelėse, transfekuotose pAcGFP-5xNF-κB-ELAM reporterine sistema, taip pat kaip ir HEK293T ląstelėse, ŽFB baltymo raiška buvo nežymi (**PRIEDU 6 pav.**). Apibendrinti A549 ląstelių, transfekuotų šiomis keturiomis vektorinėmis sistemomis, suminiai ŽFB ekspresijos rezultatai (praėjus 72 val. po transfekcijos) atvaizduoti diagramoje **3.9 pav.**



3.8 pav. ŽFB baltymo ekspresija A549 ląstelėse, paveiktose LPS, 72 val. po transfekcijos. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – transfekuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2, B – transfekuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1, C – transfekuotos pAcGFP-CCL2-1



3.9 pav. Suminė ŽFB ekspresija A549 ląstelėse, transfekuotose keturiomis vektorinėmis sistemomis, esant ir nesant stimuliacijai LPS, praėjus 72 val. po transfekcijos. CCL2-1 atitinka pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 vektorių, CCL2-2 – pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2, CCL2-2 – pAcGFP-CCL2-1, ELAM – pAcGFP-5xNF-κB-ELAM reporterines sistemas, $p > 0,05$

3.3 Planuoti, bet dėl SARS-Cov-2 pandemijos neatlikti tyrimai

Buvo suplanuota sukonstruoti reporterines sistemas su likusiomis promotorių sekomis ir patikrinti jų efektyvumą, kas nebuvo įgyvendinta dėl pandemijos. Taip pat buvo suplanuota įklonuoti likusius *CCL2* promotorių konstruktus į pAcGFP1-1 vektorių. Tada patikrinti šių ir likusių, jau sukonstruotų, reporterinių sistemų struktūros teisingumą. Buvo planuojama plačiau įvertinti konstruktų efektyvumą vykdant transfekuotų ląstelių FACS analizę.

Dėl karantino buvo nutrauktas ir NF-κB reporterinių sistemų efektyvumo tyrimas HCT 116 (laukinio tipo), HCT 116^{p53/-p53}, kuriose p53 raiška buvo nuslopinta ir HCT 116 shK ląstelėse (kontrolinėse ląstelėse). Šių eksperimentų pagalba buvo tikimasi iširti p53 baltymo įtaką NF-κB reporterinių sistemų efektyvumui po poveikio jonizuojančia spinduliuote. Taip pat planuose buvo ir sukūrimas reporterinės ląstelių linijos, pasižyminčios stabilia NF-κB atsako reporterio raiška.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

NF- κ B veiksniai atliekà svarbų vaidmenį organizmo vystymesi, imuninės sistemos homeostazėje, epitelio, skeleto, nervinėse sistemose ir kt. (Zeuner et al., 2017). Šios šeimos nariai yra žinomi ir kaip turintys svarbų vaidmenį uždegiminėse reakcijose (Kuba et al., 2020). NF- κ B reporterinės sistemos yra naudojamos stebėti NF- κ B kelio aktyvumą ir tirti naujas terapijas (Badr et al., 2009). Šio tyrimo uždaviniai buvo PGR metodu padauginti *CCL2* ir *ELAM* promotorius, juos įklonuoti į pAcGFP1-1 vektorių, tada sukurtas reporterines sistemas padauginti *E. coli* ląstelių pagalba. Buvo užsibrėžta patikrinti sistemų struktūros teisingumą, transfekuoti jas į HEK293T ir A549 ląsteles, iširti reporterinių sistemų efektyvumą, paveikiant LPS dirgikliais. Taip pat buvo iškeltas uždavinys iširti NF- κ B sistemų efektyvumą, transfekuojuant jas į HCT 116, HCT 116^{p53/p53} ir HCT 116 shK ląsteles ir paveikiant JS, ir išanalizuoti p53 baltymo poveikį NF- κ B kelio aktyvumui. Tačiau pastarasis uždavinys buvo neįgyvendintas dėl susidariusios situacijos.

Remiantis šio darbo rezultatais, galima teigti, kad NF- κ B atsako promotoriaus DNR sekos: *CCL2* ir *ELAM* promotorinės sekos su prijungtomis sintetinėmis 5xNF- κ B sekomis ir *CCL2* promotorinė seka be papildomų NF- κ B sekų, buvo sėkmingai įklonuotos į vektorių pAcGFP1-1. Sukonstruotos reporterinės sistemos buvo padaugintos naudojant *E. coli* bakterijas. Reporterinių sistemų, išskirtų iš bakterijų, struktūrų teisingumas buvo patikrintas atliekant karpymą su restrikcijos endonukleazėmis. Patikrinus sukonstruotų pAcGFP-5xNF κ B-CCL2-1 ir pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM reporterinių sistemų struktūras, nustatyta, kad jos atitiko teoriškai nustatytas. Kitų reporterinių sistemų struktūros nebuvo spėtos tinkamai patikrinti dėl susidariusios situacijos. Tačiau galima manyti, kad pAcGFP-5xNF κ B-CCL2-2 ir pAcGFP-CCL2-1 reporterinių sistemų struktūra visgi buvo teisinga, kadangi, po transfekcijos šiomis sistemomis, ląstelės ekspresavo ŽFB baltymą kaip ir pAcGFP-5xNF κ B-CCL2-1 reporterinė sistema.

Aptariant rezultatus, susijusius su vektorinių sistemų transfekcija į HEK293T ir A549 ląsteles, bei sistemų efektyvumo tikrinimu, buvo sėkmingai įvykdyta šių ląstelių linijų transfekcija sukurtais reporterinėmis sistemomis: pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1, pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2, pAcGFP-CCL2-1 ir pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM. Nustatyta, kad HEK293T ląstelės geriau transfekuoja, jų suminė ŽFB ekspresija yra didesnė, palyginant su A549 ląstelėmis. Šių ląstelių savybė gerai transfekuotis yra jau seniai pastebėta mokslo pasaulyje. Jos dažnai naudojamos tyrimams, kurie reikalauja transfekcijos metodo (Thomas, Smart, 2004). Pažymėtina tai, kad pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM vektorinė sistema, kuri turėjo būti kaip

teigiama kontrolė, šiame eksperimente visai neveikė nei HEK293T, nei A549 ląstelėse. Nors patikrinus struktūrą RE, buvo gauti tokie rezultatai, kokių tikėtasi. Tačiau praktiškai panaudojus vektorinę sistemą, ŽFB ekspresijos beveik nebuvo pastebėta. Tikėtina, kad *ELAM* promotorius pagrindu sukurta reporterinė sistema nebuvo tinkama teigiama kontrolė HEK293T ar A549 ląstelėse. Taip gali būti dėl pačio promotoriaus prigimties. pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterinės sistemos pasižymėjo ŽFB raiška, nors ji labai nesiskyrė tarp HEK293T ląstelių, esant ir nesant poveikiui LPS. Tarp ląstelių grupių, LPS paveiktų ir nepaveiktų, paskaičiuotas SŽE skirtumas nebuvo statistiškai patikimas. HEK293T ląstelės, nepaveiktos LPS, turėjo šiek tiek didesnę suminę ŽFB ekspresiją nei ląstelės, kurios buvo stimuliuotos LPS. Tai galima paaiškinti tuo, kad HEK293T ląstelės neturi TLR4 receptorių, prie kurių jungiasi LPS molekulės (Quevedo-Diaz et al., 2010). Panašu, kad poveikis LPS ląstelių ŽFB raiškai nedarė reikšmingos įtakos. Kad buvo mažiau ekspresuojama ŽFB LPS+ sąlygomis, gali būti tik atsitiktinumas. Iš esmės, ŽFB raiška turėjo būti panaši tiek LPS+, tiek ir LPS- ląstelėse.

A549 ląstelių atveju taip pat nebuvo didelio skirtumo esant ir nesant poveikiui LPS. Paskaičius nustatyta, kad ląstelėse transfekuotose pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1, pAcGFP-CCL2-1, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 vektorinėmis sistemomis, suminė ŽFB ekspresija buvo šiek tiek didesnė esant poveikiui LPS. Kaip tikėtasi, taip galėjo įvykti dėl to, nes LPS yra endotoksinai, jie skatina NF-κB veiksmų aktyvaciją (Sakai et al., 2017). Šie veiksniai intensyviau jungiasi prie savo taikinių sekų, todėl gali būti ekspresuojama daugiau genotaikinio produkto. Kadangi tie skirtumai tarp LPS+ ir LPS- ląstelių nebuvo statistiškai patikimi, tai galima numanyti, jog prie NF-κB sekų galėjo jungtis ir kiti transkripcijos veiksniai ir trukdyti prisijungti branduolio κB veiksmams. Taip jie galėjo nulemti gana aukštą bazinę ŽFB raišką. Palyginus HEK293T ir A549 ląstelėse skirtingų reporterinių sistemų efektyvumą, buvo paskaičiuota, kad pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterinė sistema pasižymėjo didžiausia sumine ŽFB ekspresija po poveikio LPS. Tačiau šis skirtumas taip pat nebuvo statistiškai patikimas. pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 sistema turėjo 5 sintetines NF-κB jungimosi sekas ir 2 endogenines, esančias *CCL2* promotoriaus sudėtyje. Sunku tiksliai pasakyti dėl ko būtent ši vektorinė sistema veikė efektyviausiai. pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 reporterinėje sistemoje buvo naudojamas trumpiausias *CCL2* promotorius regionas (CCL2-GFP5) ir tai, galbūt, sumažino tikimybę prie šio promotoriaus fragmento jungtis kitiems transkripcijos aktyvikliams, pavyzdžiui, kaip Sp1. Taip pat mažesnis endogeninių NF-κB jungimosi sekų kiekis, galbūt, lėmė ir tai, kad prie šio promotoriaus fragmento mažiau jungėsi

kiti transkripcijos veiksniai, kurie taip pat turi specifiškumą šioms sekoms. Žinoma, kad prie pilno *CCL2* promotoriaus GAS ir IRIS sričių dar jungiasi STAT1 baltymas, kuris irgi kontroliuoja jo veiklą. Palikus tik dvi NF-κB jungimosi sritis, tikėtina, kad promotoriaus veikla buvo reguliuojama tik NF-κB veiksmų (Yoshimura, 2018). Todėl šis konstruktas ir buvo daugiau specifiškesnis branduolio veiksmams κB. O tai kartu lėmė ir didesnę ŽFB baltymo produkciją. Remiantis kitų mokslininkų – El-Guendy ir Sinai tyrimu buvo nustatyta, kad turinčios ŽFB reporterį sistemos ne visada tiksliai atspindi NF-κB kelio veiklą. Taip pat, kad nėra pakankama naudoti tyrime tik vieną stimuliatorių. Tiksliau yra naudoti abu – tiek TNF-α, tiek ir LPS (El-Guendy, Sinai, 2008).

Dėl susidariusios situacijos buvo nespėta atlikti dalies suplanuotų darbų. Turėjo būti sukonstruotos likusios reporterinės sistemos. HCT 116 (laukinio tipo), HCT 116^{-p53/-p53} (p53 baltymo raiška nuslopinta) ir HCT 116 shK (kontrolinės) ląstelės turėjo būti transfekuotos tais pačiais trimis vektoriniais konstruktais: pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1, pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2, pAcGFP-CCL2-1 ir naujai sukonstruotais, kad įvertinti p53 baltymo įtaką NF-κB reporterinių sistemų efektyvumui. Taip pat buvo planuojama iširti reporterinių sistemų efektyvumo pokyčius paveikus jonizuojančia spinduliuote (JS). Yra žinoma, kad ląstelės, turinčios neveiklų p53 yra jautresnės JS poveikiui (Matsui et al., 2001). JS taip pat aktyvina ir p53, ir NF-κB veiksmų veikimą (Ghaleb et al., 2019; Waga et al., 2019). O NF-κB slopina p53 veikimą ir atvirkščiai (Brücher et al., 2019). Įprastai nuslopinus p53 veiklą, sveikos ląstelės gali supiktybėti, ypač veikiant JS. Tačiau, jei p53 yra inaktyvuotas vėžinėse ląstelėse ir jos paveikiamos JS, tada šios ląstelės gali neatlaikyti DNR pažeidimų krūvio ir patirti apoptozę (Kakoti et al., 2019). Šio eksperimento metu tikėtina, kad būtų aktyvavęsi NF-κB veiksniai visose ląstelėse, išskyrus išveiklinto p53 HCT 116^{-p53/-p53} ląstelės. Tikėtina, kad HCT 116 (laukinio tipo) ir HCT 116 shK ląstelėse p53 galėtų slopinti NF-κB veiklą ir atvirkščiai. Todėl HCT 116^{-p53/-p53} turėtų daugiau ekspresuoti NF-κB, o tuo tarpu tų ląstelių turima reporterinė sistema daugiau ŽFB baltymo. Gali būti, kad ir šiose ląstelėse efektyvesnė būtų pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 sistema, kadangi HEK293T ir A549 ląstelių linijose ji buvo efektyviausia.

Kitų vektorių struktūra taip pat būtų patikrinta su RE. Tikėtina, kad būtų gauti teigiami rezultatai, kaip ir buvo patikrinus ankstesnes reporterines sistemas. Likusios sistemos būtų transfekuotos į ląsteles. Dėl efektyvumo, tikėtina, kad kitos sistemos nebūtų efektyvesnės už pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2, kadangi jos turėtų daugiau endogeninių NF-κB sekų, prie kurių gali jungtis ir kiti veiksniai.

Atliekant FACS analizę būtų patikrinta ŽFB raiška ir atrūšiuojamos ląstelės. Daugeliu transfekcijos atvejų nebuvo ryškaus ŽFB raiškos skirtumo tarp paveiktų LPS ir nepaveiktų ląstelių. Tai tikėtina, kad FACS metodu galėtų būti nustatyti irgi panašūs rezultatai kaip ir tranfekcijos metu. Galima spėti, kad tarp LPS paveiktų ir nepaveiktų ŽFB ekspresuojančių ląstelių grupių nebūtų ryškių skirtumų ir FACS metodu.

Vykdamas transfektuotų ląstelių selekciją genetine, būtų galima išvesti ląstelių linijas, kurios turėtų aktyvią reporterių transkripciją ir, galbūt, geresnį atsaką į LPS stimuliavimą. Remiantis El-Guendy ir Sinai tyrimu, jiems pavyko transfekuoti ląstelių liniją reporterinėmis NF- κ B atsako sistemomis ir išvesti stabiliai jas ekspresuojančią ląstelių liniją (El-Guendy, Sinai, 2008). Tokios reporterinės ląstelės galėtų būti naudojamos ir kitiems tyrimams.

Apibendrinant, NF- κ B reporterinės sistemos gali būti naudojamos tirti ląstelėse NF- κ B veiksmų veiklą, jų sukeltus poveikius, tokius kaip uždegiminiai, oksidaciniai ir kiti procesai. Tačiau šiame darbe jų veikimo efektyvumas atsake į LPS neatsiskleidė. HEK293T ir A549 ląstelėse nebuvo statistiškai patikimų ŽFB ekspresijos skirtumų tarp stimuliuotų LPS ir nestimuliuotų ląstelių. Nors nustatyta, kad efektyviausia yra pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 reporterinė sistema, tačiau taip pat nebuvo pastebėta statistiškai patikimo skirtumo, esant poveikiui LPS. Ateityje būtų naudinga pakartoti tyrimus ir su kitą ląstelių linija, kad patvirtinti, ar šių reporterinių sistemų atsakas į LPS tikrai nėra veiksmingas. Taip pat galima būtų iširti ne tik atsaką į LPS, bet ir į TNF- α dirgiklį.

IŠVADOS

1. Naudoti genų inžinerijos metodai leido sukurti suplanuotos struktūros NF-κB reporterinius vektorius, patvirtinti jų struktūrą ir transfekuoti sukurtomis NF-κB sistemomis HEK293T ir A549 ląstelių linijas.
2. Sukurtos NF-κB atsako reporterinės sistemos nėra tinkamos NF-κB veiksniais stimuliuojančio LPS poveikio šias reporterines sistemas turinčiose ląstelėse vertinimui.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Gyvybės mokslų centras
Biomokslų institutas

SAULĖ ZAGRECKAITĖ
NF-κB reporterinių sistemų kūrimas ir jų efektyvumo tyrimas

Genetikos magistro studijų baigiamasis darbas

SANTRAUKA

NF-κB veiksniai yra plačiai ekspresuojami organizme. Jų funkcijos svarbios įvairiuose ląstelių procesuose NF-κB uždegimą skatinantis kelias reguliuoja šimtus genų, jis yra susijęs su įvairių ligų atsiradimu. Branduolio veiksmų κB pagrindu sukurtos reporterinės sistemos gali būti panaudotos skirtingiems tikslams, pavyzdžiui, tirti atsaką į LPS.

Šiame darbe buvo nagrinėjamas NF-κB reporterinių sistemų konstravimas ir analizuojamas jų efektyvumas HEK293T ir A549 ląstelių linijose. Reporterinės sistemos buvo sukonstruotos *CCL2* ir *ELAM* promotorių pagrindu, taip pat panaudoti sintetiniai NF-κB atsako elementai ir ŽFB reporterinis genas. Jo raiška buvo stimuliuota LPS, kuris įjungia NF-κB kelią. Nustatyta, kad HEK293T ląstelėse, transfekuotose reporterinėmis sistemomis, suminė ŽFB ekspresija (SŽE) buvo šiek tiek didesnė nesant LPS stimuliacijai. A549 ląstelių atveju SŽE buvo šiek tiek didesnė, kai ląstelės buvo stimuliuojamos LPS. Ištirta, kad, esant poveikiui LPS, abiejose ląstelių linijose efektyviausiai veikė pAcGFP-5xNF-κB-*CCL2-2* sistema. Tačiau sukonstruotos NF-κB atsako reporterinės sistemos nepasizymėjo efektyvumu, veikiant ląsteles LPS dirgikliais. Tarp sistemų esantys skirtumai nebuvo statistiškai patikimi.

VILNIUS UNIVERSITY

Life Sciences Center

Institute of Biosciences

SAULĖ ZAGRECKAITĖ

NF- κ B Reporter System Design and Efficiency Analysis

Master Thesis

SUMMARY

NF- κ B factors are broadly expressed in many different cells, they are important in many cellular processes. NF- κ B pro-inflammatory signaling pathway stimulates expression of hundreds of genes and it has been implicated in many diseases. NF- κ B reporter systems can be used for different purposes, for example to analyse response to the LPS stimulation.

The aim of this study was to design NF- κ B reporter systems and analyze their efficiency using HEK293T and A549 cell lines. These reporter systems were designed based on *CCL2* and *ELAM* promoters. Synthetic NF- κ B binding sites, GFP reporter gene were also used in the design of reporter systems. It is known that LPS stimulates NF- κ B activation, thus LPS was used as an activator to promote GFP expression. It was established that HEK293T cells showed slightly higher GFP expression without LPS stimulation. However, A549 cell line showed slightly higher GFP expression when stimulated with LPS. The study also revealed that pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 reporter system was slightly more effective. Taken together, NF- κ B reporter systems did not show a significant response to LPS stimulation.

PADĖKA

Nuoširdžiai noriu padėkoti savo magistrinio darbo vadovams: dr. Eglei Balčiūnaitei už patarimus, reikiamą pagalbą darbo metu, kantrybę, pamokas ir skatinimą tobulėti, daugiau savarankiškai dirbti. Prof. dr. Kęstučiui Sužiedėliui už galimybę išmokti praktikuotis, išmokti naujų metodų, už pagalbą su darbais, patarimus. Taip pat ir NVI Molekulinės onkologijos laboratorijos darbuotojams ir kolegoms praktikantams, kurie padėjo atliekant praktikos darbus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abraham AC, Shah SA, Golman M, Song L, Li X, Kurtaliaj I, Akbar M, Millar NL, Abu-Amer Y, Galatz LM, Thomopoulos S. Targeting the NF- κ B signaling pathway in chronic tendon disease. *Sci Transl Med*. 2019;11(481).
Adresas: <https://www.invivogen.com/>
2. Afonina IS, Zhong Z, Karin M, Beyaert R. Limiting inflammation—the negative regulation of NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2017;18(8):861–869.
3. An J, Kim SH, Hwang D, Lee KE, Kim MJ, Yang EG, Kim SY, Chung HS. Caspase-4 disaggregates lipopolysaccharide micelles via LPS-CARD interaction. *Sci Rep*. 2019;9(1):826.
4. Anton BP, Raleigh EA. Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of Escherichia coli K-12 DH5 α . *Genome Announc*. 2016;4(6):e01245-16.
5. ATTC [internetinė svetainė]. Sukurta 2016 [atnaujinta 2020; cituota 2020-04-09].
Adresas: <https://www.lgcstandards-atcc.org/en.aspx>
6. Babini G, Morini J, Baiocco G, Mariotti L, Ottolenghi A. In vitro γ -ray-induced inflammatory response is dominated by culturing conditions rather than radiation exposures. *Sci Rep*. 2015;5:9343.
7. Badr CE, Niers JM, Tjon-Kon-Fat LA, Noske DP, Wurdinger T, Tannous BA. Real-time monitoring of nuclear factor kappaB activity in cultured cells and in animal models. *Mol Imaging*. 2009;8(5):278-90.
8. Battin C, Hennig A, Mayrhofer P, Kunert R, Zlabinger GJ, Steinberger P, Paster W. A human monocytic NF- κ B fluorescent reporter cell line for detection of microbial contaminants in biological samples. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0178220.
9. Best KT, Lee FK, Knapp E, Awad HA, Loiselle AE. Deletion of NFKB1 enhances canonical NF- κ B signaling and increases macrophage and myofibroblast content during tendon healing. *Sci Rep*. 2019;9(1):10926.
10. Bonapace L, Coissieux MM, Wyckoff J, Mertz KD, Varga Z, Junt T, Bentires-Alj M. Cessation of CCL2 inhibition accelerates breast cancer metastasis by promoting angiogenesis. *Nature*. 2014;515(7525):130-3.
11. BPS Bioscience [internetinė svetainė]. BPS Bioscience, Inc. Sukurta 2016; [atnaujinta 2020; cituota 2020-03-02]. Adresas: <https://bpsbioscience.com/>
12. Brown, CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. *Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway*. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):862–873.
13. Brucher B, Lang F, Jamall IS. NF- κ B signaling and crosstalk during carcinogenesis. *Open*. 2019;2(13):35-.
14. Collignon E, Canale A, Al Wardi C, Bizet M, Calonne E, Dedeurwaerder S, Garaud S, Naveaux C, Barham W, Wilson A, Bouchat S, Hubert P, Van Lint C, Yull F, Sotiriou C, Willard-Gallo K, Noel A, Fuks F. Immunity drives TET1 regulation in cancer through NF- κ B. *Sci Adv*. 2018;4(6):eaap7309.
15. Correa GR, Tergaonkar V, Ng JK, Dubova I, Izpisua-Belmonte Jc, Verma IM. Characterization of NF- κ B/I κ B Proteins in Zebra Fish and Their Involvement in Notochord Development. *Molecular and Cellular Biology*. 2004;24(12):5257-5268.
16. Cui Y, Guo G. Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11).
17. Deng X, Xu M, Yuan C, Yin L, Chen X, Zhou X, Li G, Fu Y, Feghali-Bostwick CA, Pang L. Transcriptional regulation of increased CCL2 expression in pulmonary fibrosis involves nuclear factor- κ B and activator protein-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(7):1366-76.

18. Dorrington MG, Fraser IDC. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front Immunol.* 2019;10:705.
19. El-Guendy N, Sinai AP. Potential problems inherent in cell-based stable NF-kappaB-GFP reporter systems. *Mol Cell Biochem.* 2008;312(1-2):147-55.
20. Eukaryotic Promoter Database [internetinē svetainē]. Sukurta 1986 [atnaujinta 2019; cituota 2020-04-15]. Adresas: <https://epd.epfl.ch//index.php>
21. Fantuzzi L, Spadaro F, Purificato C, et al. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation is required for CCR5-dependent, NF-kB-driven CCL2 secretion elicited in response to HIV-1 gp120 in human primary macrophages. *Blood.* 2008;111(7):3355-3363.
22. Finzer P, Soto U, Delius H, Patzelt A, Coy JF, Poustka A, zur Hausen H, Rösl F. Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: The role of the chromatin structure and AP-1 composition. *Oncogene.* 2000;19:3235–3244.
23. Fu X, Liu B, Wang Y, Li J, Zhu P, Li T, Tse K, Chou J, Yin C, Bai J, Liu Y, Chen Y, Yu Z. Activation of STAT3 is a key event in TLR4 signaling-mediated melanoma progression. *Cell Death Dis.* 2020;11:246.
24. Fusella F, Seclì L, Busso E, Krepelova A, Moiso E, Rocca S, Conti L, Annaratone L, Rubinetto C, Mello-Grand M, Singh V, Chiorino G, Silengo L, Altruda F, Turco E, Morotti A, Oliviero S, Castellano I, Cavallo F, Provero P, Tarone G, Brancaccio M. The IKK/NF- κ B signaling pathway requires Morgana to drive breast cancer metastasis. *Nat Commun.* 2017;8(1):1636.
25. Garay-Malpartida HM, Mourão RF, Mantovani M, Santos IA, Sogayar MC, Goldberg AC. Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in human and murine pancreatic beta-cells affects cell viability and insulin homeostasis. *BMC Immunol.* 2011;12:18.
26. Ghaleb A, Yallowitz A, Marchenko N. Irradiation induces p53 loss of heterozygosity in breast cancer expressing mutant p53. *Commun Biol.* 2019;2:436.
27. Gudkov AV, Gurova KV, Komarova EA. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. *Genes Cancer.* 2011;2(4):503-16.
28. Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:199–210.
29. Huang Z, Kraus VB. Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Feb;12(2):123-9.
30. Yang W, Liu L, Li C, et al. TRIM52 plays an oncogenic role in ovarian cancer associated with NF-kB pathway. *Cell Death Dis.* 2018;9(9):908.
31. InvivoGen [internetinē svetainē]. [Atnaujinta 2020, cituota 2020-02-07].
32. Yoshimura T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally?. *Cell Mol Immunol.* 2018;15:335–345.
33. Yu X, Wang M, Zuo J, et al. Nuclear factor I A promotes temozolomide resistance in glioblastoma via activation of nuclear factor κ B pathway. *Life Sci.* 2019;236:116917.
34. Yus E, Yang J, Sogues A, Serrano L. A reporter system coupled with high-throughput sequencing unveils key bacterial transcription and translation determinants. *Nat Commun.* 2017;8:368.
35. Jutz S, Leitner J, Schmetterer K, et al. Assessment of costimulation and coinhibition in a triple parameter T cell reporter line: Simultaneous measurement of NF- κ B, NFAT and AP-1. *J Immunol Methods.* 2016;430:10-20.
36. Kakoti S, Yamauchi M, Gu W, Kato R, Yasuhara T, Hagiwara Y, Laskar S, Oike T, Sato H, Held KD, Nakano T, Shibata A. p53 deficiency augments nucleolar instability after ionizing irradiation. *Oncol Rep.* 2019;42(6):2293-2302.

37. Kaltschmidt C, Banz-Jansen C, Benhidjeb T, Beshay M, Förster C, Greiner J, Hamelmann E, Jorch N, Mertzlufft F, Pfitzenmaier J, Simon M, Schulte Am Esch J, Vordemvenne T, Wähnert D, Weissinger F, Wilkens L, Kaltschmidt B. A Role for NF- κ B in Organ Specific Cancer and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5):655.
38. Kerget B, Araz O, Erdem HB, Akgün M. The Frequency of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Polymorphism in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Lung*. 2019;197(5):585-592.
39. Khongthong P, Roseweir AK, Edwards J. The NF- κ B pathway and endocrine therapy resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2019;26(6):R369-R380.
40. Kuba A, Raida L, Mrazek F, Schneiderova P, Kriegova E, Langova K, Furst T, Furstova J, Faber E, Papajik T. NFKB1 gene single-nucleotide polymorphisms: implications for graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2020;99(3):609-618.
41. Kuri P, Ellwanger K, Kufer TA, Leptin M, Bajoghl B. A high-sensitivity bi-directional reporter to monitor NF- κ B activity in cell culture and zebrafish in real time. *Journal of Cell Science*. 2017;130:648-657.
42. Li J, Mahajan A, Tsai MD. Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry*. 2006;45(51):15168-78.
43. Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, Lorne E, Abraham E. p53 Attenuates lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and acute lung injury. *J Immunol*. 2009;182(8):5063-71.
44. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther*. 2017;2:17023-.
45. Lowe JM, Menendez D, Bushel PR, Shatz M, Kirk EL, Troester MA, Garantziotis S, Fessler MB, Resnick MA. p53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res*. 2014;74(8):2182-92.
46. Manjunatha S, Shaik AH, Maruthi Prasad E, Al Omar SY, Mohammad A, Kodidhela LD. Combined cardio-protective ability of syringic acid and resveratrol against isoproterenol induced cardio-toxicity in rats via attenuating NF- κ B and TNF- α pathways. *Sci Rep*. 2020;10(1):3426.
47. Manuel Sánchez-Maldonado J, Martínez-Bueno M, Canhão H, Ter Horst R, Muñoz-Peña S, Moñiz-Díez A, Rodríguez-Ramos A, Escudero A, Sorensen SB, Hetland ML, Ferrer MA, Glintborg B, Filipescu I, Pérez-Pampin E, Conesa-Zamora P, García A, den Broeder A, De Vita S, Hove Jacobsen SE, Collantes E, Quartuccio L, Netea MG, Li Y, Fonseca JE, Jurado M, López-Nevot MÁ, Coenen MJH, Andersen V, Cáliz R, Sainz J. NFKB2 polymorphisms associate with the risk of developing rheumatoid arthritis and response to TNF inhibitors: Results from the REPAIR consortium. *Sci Rep*. 2020;10(1):4316.
48. Matsui Y, Tsuchida Y, Keng PC. Effects of p53 Mutations on Cellular Sensitivity to Ionizing Radiation. *Am J Clin Oncol*. 2001;24(5):486-490.
49. Nakatsumi H, Matsumoto M, Nakayama KI. Noncanonical Pathway for Regulation of CCL2 Expression by an mTORC1-FOXK1 Axis Promotes Recruitment of Tumor-Associated Macrophages. *Cell Rep*. 2017;21(9):2471-2486.
50. Nature [internetinè svetainè]. Sukurta 1996 [atnaujinta 2020; cituota 2020-04-11]. Adresas: <https://www.nature.com/>
51. Osorio FG, de la Rosa J, Freije JM. Luminescence-based in vivo monitoring of NF- κ B activity through a gene delivery approach. *Cell Commun Signal*. 2013;11(1):19.
52. Owens TW, Taylor RJ, Pahil KS, Bertani BR, Ruiz N, Kruse AC, Kahne D. Structural basis of unidirectional export of lipopolysaccharide to the cell surface. *Nature*. 2019;567(7749):550-553.
53. Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;5(2):15.

54. Pires BRB, Silva RCMC, Ferreira GM, Abdelhay E. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes (Basel)*. 2018;9(1):24.
55. Quevedo-Diaz MA, Song C, Xiong Y, Chen H, Wahl LM, Radulovic S, Medvedev AE. Involvement of TLR2 and TLR4 in cell responses to Rickettsia akari. *J Leukoc Biol*. 2010;88(4):675-85.
56. Sakai J, Cammarota E, Wright JA, Cicuta P, Gottschalk RA, Li N, Fraser IDC, Bryant CE. Lipopolysaccharide-induced NF- κ B nuclear translocation is primarily dependent on MyD88, but TNF α expression requires TRIF and MyD88. *Sci Rep*. 2017;3;7(1):1428.
57. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*. 1962;59(3):223-39.
58. Shirley JL, de Jong YP, Terhorst C, Herzog RW. Immune Responses to Viral Gene Therapy Vectors. *Mol. Ther*. 2019;28(3):709-722.
59. Siggers T, Chang AB, Teixeira A, Wong D, Williams KJ, Ahmed B, Ragoussis J, Udalova IA, Smale ST, Bulyk ML. Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF-kappaB family DNA binding. *Nat. Immunol*. 2012;13:95-102.
60. Silva Ruiz M, van der Ende-Metselaar H, Mulder LH, Smit J, Rodenhuis-Zybert AI. Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. *Sci Rep*. 2016;6:32288.
61. Takara Bio [internetinè svetainë]. Takara Bio Inc. Sukurta 2018; [atnaujinta 2020; cituota 2020-04-09]. Adresas: <https://www.takarabio.com/about>
62. Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*. 2018;18:309-324w.
63. Thoma A, Lightfoot AP. NF- κ B and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1088:267-279.
64. Thomas P, Smart TG. HEK293 Cell Line: A Vehicle for the Expression of Recombinant Proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187-200.
65. Tornatore L, Sandomenico A, Raimondo D, Low C, Rocci A, Tralau-Stewart C, Capece D, D'Andrea D, Bua M, Boyle E, van Duin M, Zoppoli P, Jaxa-Chamiec A, Thotakura AK, Dyson J, Walker BA, Leonardi A, Chambery A, Driessen C, Sonneveld P, Morgan G, Palumbo A, Tramontano A, Rahemtulla A, Ruvo M, Franzoso G. Cancer-selective targeting of the NF- κ B survival pathway with GADD45 β /MKK7 inhibitors. *Cancer Cell*. 2014;26(4):495-508.
66. Verzella D, Pescatore A, Capece D. Life, death, and autophagy in cancer: NF- κ B turns up everywhere. *Cell Death Dis*. 2020;11:210.
67. Waga K, Yamaguchi M, Miura S, et al. IKK β Inhibitor IMD-0354 Attenuates Radiation Damage in Whole-body X-Irradiated Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:5340290.
68. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(9):823-830.
69. Xia L, Tan S, Zhou Y, Lin J, Wang H, Oyang L, Tian Y, Liu L, Su M, Wang H, Cao D, Liao Q. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther*. 2018;11:2063-2073.
70. Xu L, Zhao P, Xu Y, Gao L, Wang H, Jis X, Ma H, Liang X, Ma C, Gao L. Tim-4 protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by suppressing the NF- κ B signaling pathway. *Lab Invest*. 2016;96:1189-1197.
71. Zariri A, Pupo E, van Riet E, van Putten JP, van der Ley P. Modulating endotoxin activity by combinatorial bioengineering of meningococcal lipopolysaccharide. *Sci Rep*. 2016;6:36575.

72. Zeuner MT, Vallance T, Vaiyapuri S, Cottrell GS, Widera D. Development and Characterisation of a Novel NF- κ B Reporter Cell Line for Investigation of Neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:6209865.
73. Zhao W, Ma L, Cai C, Gong X. Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF- κ B and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. *Int J Biol Sci.* 2019;15(8):1571-1581.

PRIEDAI

1 lentelė. DNR fragmentų su *CCL2* arba *ELAM* promotoriumi (ir 5xNF-κB sekomis) padauginimui PGR metodu naudoti pradmenys

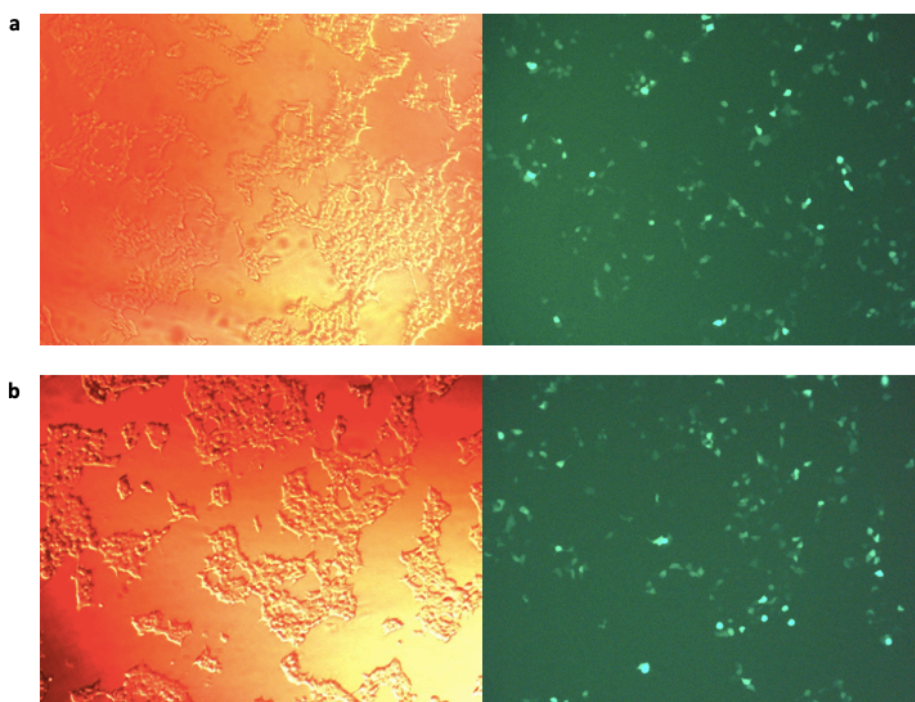
Promotoriaus konstrukto pavadinimas (ilgis bp)	Tiesioginis pradmuo/Atvirkštinis pradmuo
CCL2-GFP-1 (825 bp)	TAAGCAGAATCCCCGAAATACTCCTCCACTGC/ TGCTTAGGATCCGAGAGTGCGAGCTTCAGTTTG
CCL2-GFP-2 (238 bp)	GGACTTCCACTTGGTACCAGTGTCTCGTCCTGACCC/ TGCTTAGGATCCGAGAGTGCGAGCTTCAGTTTG
CCL2-GFP-3 (694 bp)	TAAGCAGAATCCTAAAGTTGGGGAATTTACAG/ TGCTTAGGATCCCAGCCTCTCGGTTCCCTCTGG
CCL2-GFP-4 (825 bp)	TAAGCAGAATCCCCGAAATACTCCTCCACTGC/ TGCTTAGGATCCGAGAGTGCGAGCTTCAGTTTG
CCL2-GFP-5 (238 bp)	GGACTTCCACTTGGTACCAGTGTCTCGTCCTGACCC/ TGCTTAGGATCCGAGAGTGCGAGCTTCAGTTTG
CCL2-GFP-6 (694 bp)	TAAGCACTCGAGATCTGCGATCGCTGAATTC/ TGCTTAGGATCCCAGCCTCTCGGTTCCCTCTGG
5xNF-κB-ELAM (284 bp)	TAAGCACTCGAGATCTGCGATCGCTGAATTC/ TGCTTAGGATCCCTCTGTCTCAGGTCAGTA

2 lentelė. Plazmidės karpymo su RE mišinio komponentai ir jų kiekiai

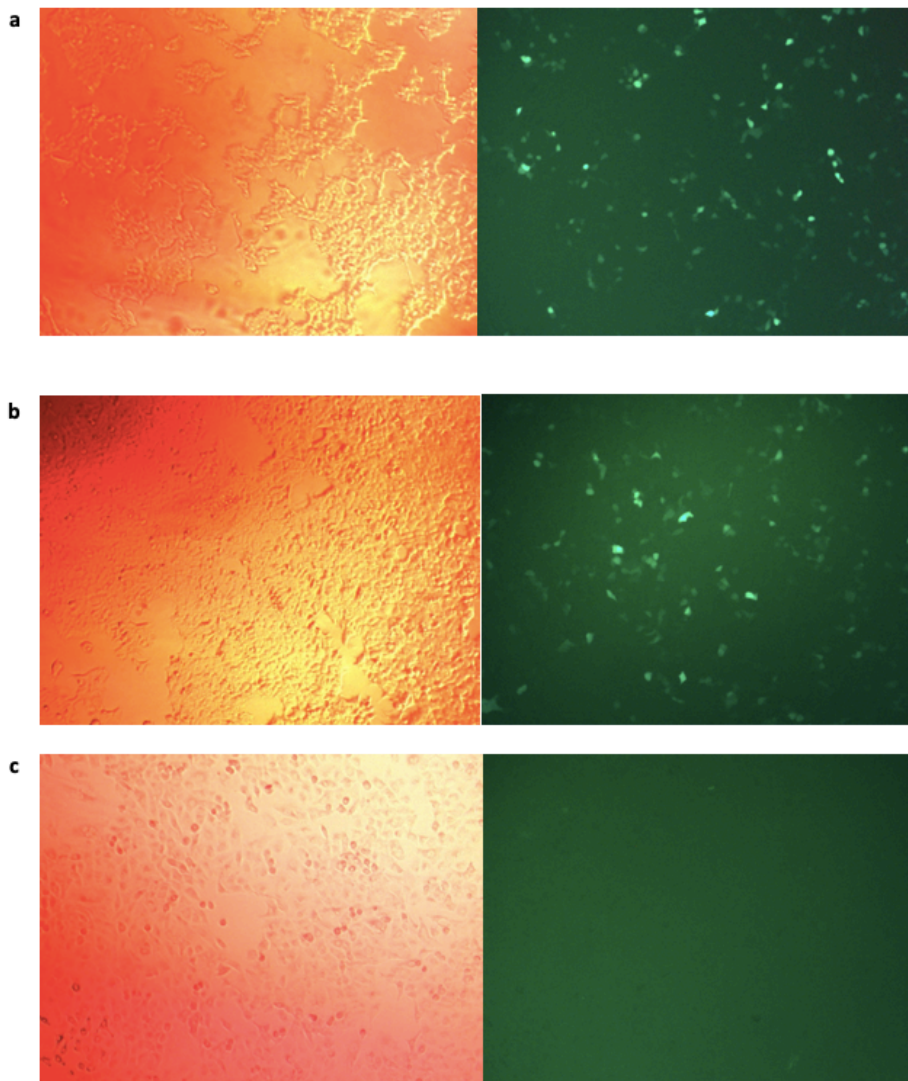
Karpymo su RE reakcijos mišinys vienam mėginiui	
Medžiaga	Galutinė koncentracija mėgintuvėlyje
Sterilus dejonizuotas vanduo	iki 50 μ l
10x „FastDigest“ buferis	1x
„FastDigest“ restriktazės	2 μ l + 2 μ l
„FastAP“	2 μ l
Plazmidinė DNR	2 μ g

3 lentelė. DNR fragmentų su NF-κB atsako promotoriaus sekomis karpymo su RE komponentai ir jų kiekiai

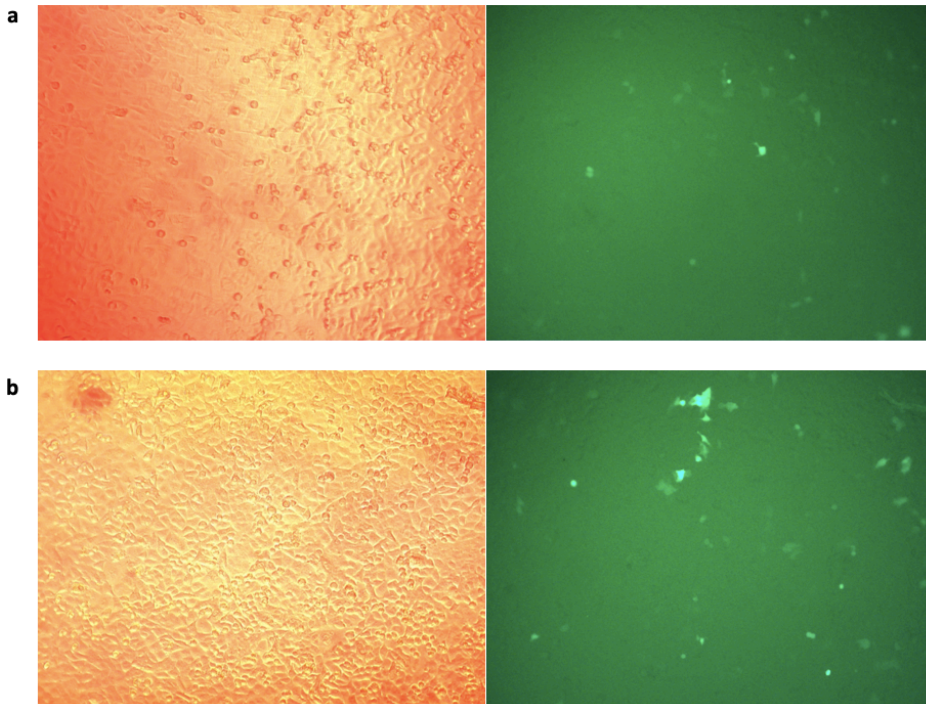
DNR karpymo su RE reakcijos mišinys vienam mėginiui	
Medžiaga	Galutinė koncentracija mėgintuvėlyje
Sterilus dejonizuotas vanduo	iki 30 μ l
10x „FastDigest“ buferis	1x
„FastDigest“ restriktazės	1 μ l + 1 μ l
DNR	0,2 μ g



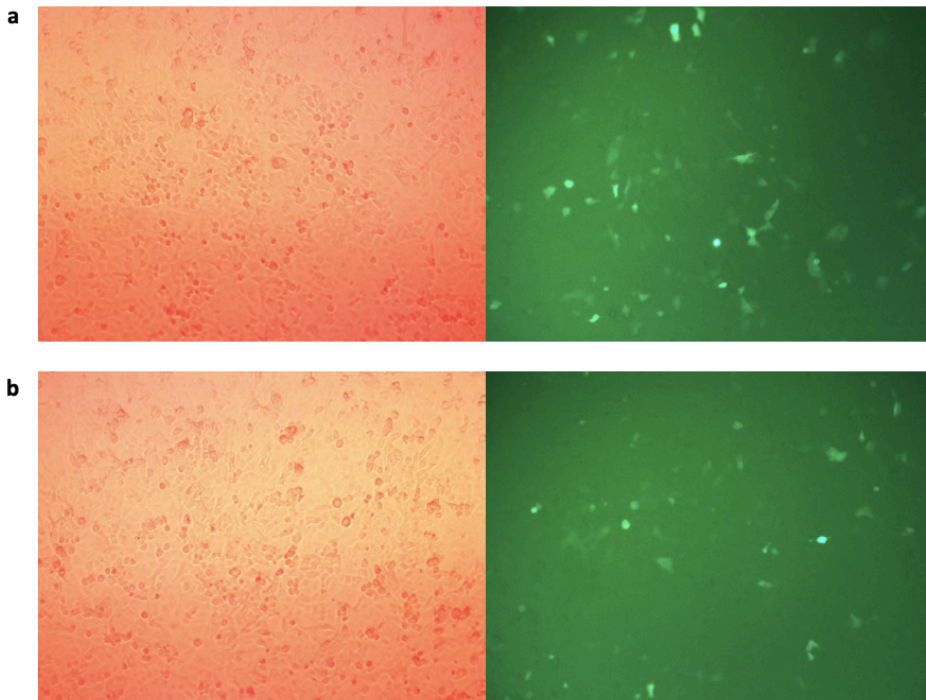
1 pav. ŽFB baltymo ekspresija HEK293T ląstelėse, praėjus 24 val. po transfekcijos. Ląstelės transfektuotos pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-1 reporterine sistema. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – nepaveiktos LPS ląstelės, B – paveiktos LPS ląstelės



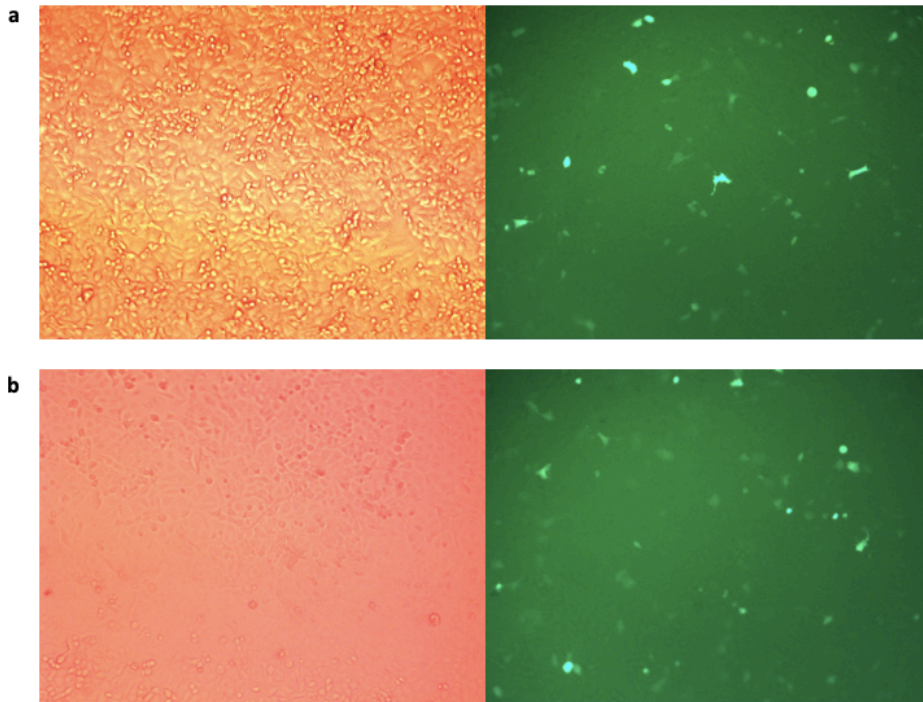
2 pav. ŽFB baltymo ekspresija HEK293T ląstelėse, praėjus 24 val. po transfekcijos. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – transfekuotos pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-1 vektoriumi, B – transfekuotos pAcGFP-5xNF- κ B-CCL2-2 vektoriumi, C – transfekuotos pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM vektoriumi



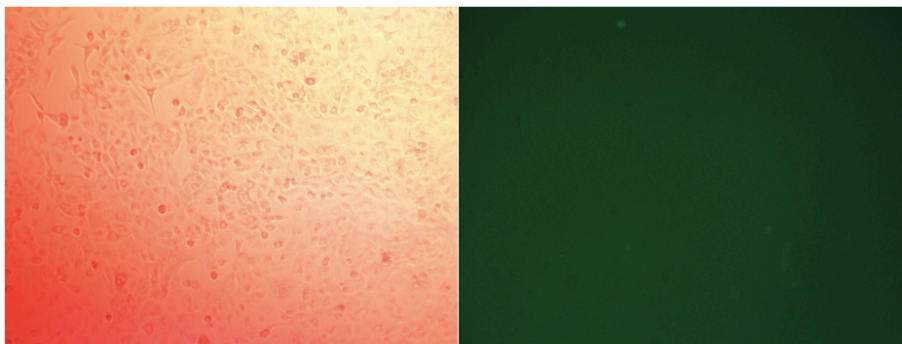
3 pav. ŽFB baltymo ekspresija A549 ląstelėse, transfekuotose pAcGFP-5xNF-κB-CCL2-2 vektoriumi, paveikus LPS. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – praėjus 24 val. po transfekcijos, B – praėjus 48 val. po transfekcijos



4 pav. ŽFB baltymo ekspresija A549 ląstelėse, transfekuotose pAcGFP-CCL2-1 vektoriumi, 72 val. po transfekcijos. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – paveiktos LPS ląstelės, B – nepaveiktos LPS ląstelės



5 pav. ŽFB baltymo ekspresija A549 ląstelėse, transfekuotose pAcGFP-CCL2-1 vektoriumi, 72 val. po transfekcijos. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės. A – paveiktos LPS ląstelės, B – nepaveiktos LPS ląstelės



6 pav. ŽFB ekspresija A549 ląstelėse, praėjus 72 val. po transfekcijos, paveiktos LPS. Ląstelės transfekuotos pAcGFP-5xNF- κ B-ELAM vektoriumi. Kairėje paveikslėlio dalyje vaizduojamos balta šviesa apšviestos ląstelės, dešinėje – tik 475 nm ilgio bangomis apšviestos ląstelės