

**Vilniaus Universitetas**  
**Gyvybės mokslų centras**  
**Genetikos katedra**



**Genetikos programos magistrantė**  
**Kristina Bastytė**

**Magistrinis darbas**

**Transkripcijos veiksnio c-Jun vaidmuo krūties vėžio MCF-7 linijos ląstelėms atsakant į aplinkos kietumo pokyčius**

**Darbo vadovė:**

**dr. Daiva Baltriukienė**

**Konsultantas:**

**dokt. Egidijus Šimoliūnas**

**Transkripcijos veiksnio c-Jun vaidmuo krūties vėžio MCF-7 linijos ląstelėms atsakant į aplinkos kietumo pokyčius**

Darbas atliktas VU GMC Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriuje

Kristina Bastytė

Darbo vadovė:  
dr. Daiva BALTRIUKIENĖ

Konsultantas:  
dakt. Egidijus ŠIMOLIUNAS

## **Turinys**

|   |           |
|---|-----------|
| Santrumpų sąrašas .....   | 4         |
| Įvadas.....   | 2         |
| Tikslas ir uždaviniai .....   | 3         |
| <b>1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>1.1 Vėžys ir jį lemiantys veiksniai.....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>1.2 Krūties vėžys .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1.3 Vėžio metastazės .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1.4 Užląstelinis matriksas .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>1.5 Poliakrilamidiniai geliai ir jų pritaikomumas aplinkos kietumo tyrimams.....</b> | <b>31</b> |
| <b>1.6 Doksorubicino poveikis .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.1 Naudotos medžiagos .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>2.2 Metodai .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....</b>   | <b>43</b> |
| Išvados.....  | 51        |
| Santrauka .....   | 52        |
| Abstract.....   | 53        |
| Literatūros sąrašas .....   | 54        |

## Santrumpų sąrašas

**AP-1** – aktyvuojantis baltymas 1

**ATF** – aktyvuojantis transkripcijos veiksnys

**BRAF** - *B-Raf proto-oncogene serine/threonine kinase*

**BRMS1** – krūties vėžio metastazės supresorius 1

**bZIP** – *basic leucine zipper*

**CAF** – su vėžiu asocijuoti fibroblastai

**CCN1** – *CNN family member 1*

**CK18** – citokeratinas-18

**CRSP3** - *Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23*

**CSC** – vėžinė kamieninė ląstelė

**Dhh** – *dessert hedgehog*

**E2** – estradiolis

**ECM** – užląstelinis matriksas

**EGFR** – epidermio augimo veiksnio receptorius

**EMT** – epitelinė mezenchiminė tranzicija

**ER** – estrogeno receptorius

**ERK** – užląstelinių signalų reguliuojama kinazė

**FACIT** - *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices*

**FA** – fokalinės adhezijos

**FAK** – fokalinės adhezijos kinazė

**FOXC2** – *forkhead box C2*

**GSK-3 $\beta$**  – glikogeno sintazės kinazė 3 $\beta$

**HER2** – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorius 2

**Hh** - *hedgehog*

**HR** – hormonų receptorius

**HRP** – krienų peroksidazė

**YAP** - Yes Associated Protein

**IGF-IR** – *insulin-like growth factor I receptor*

**Ihh** – *indian hedgehog*

**JNK** – c-Jun N-terminalinė kinazė

**KLF8** - *Krueppel-like factor 8*

**LEF-1** – limfoidinis enhancerį prisijungiantis veiksnys 1

**LINC** - *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*

**LOX** – *lysyl oxidase*

**LRP** - *lipoprotein receptor-related protein*

**MAPK** – mitogenų aktyvuojama baltymų kinazė

**MMP** – *matrix metalloproteinase*

**TAZ** - Transcriptional Co-Activator With PDZ-Binding Motif

**TGF- $\beta$**  – *tumor growth factor  $\beta$*

**VEGF** –vascular endotelial growth factor

## Įvadas

Vėžys – klastinga liga, gebanti išvystyti daug adaptacijos būdų, kurių dėka geba išvengti organizmo gynybos mechanizmų ir formuoti naujus vėžinius darinius, toli išplitusius nuo pradinio židinio (Hanahan & Weinberg, 2011). Užląstelinė aplinka yra svarbi reguliuojant normalų audinio funkcionavimą, atsakinga už ląstelių sąveiką bei orientaciją aplinkoje. Tinkamos sudėties ir fizikomechaninių savybių užląstelinė aplinka palaiko ir užtikrina ląstelių tarpusavio ryšius, prisideda prie ląstelių likimo reguliacijos (Walker *et al.*, 2018). Yra pastebėta, kad skirtingas užląstelinės aplinkos kietumas skatina kryptingą ląstelių judėjimą iš minkštesnės aplinkos kietesnės link. Toks kryptingas judėjimas yra būdingas tiek sveikoms ląstelėms, pvz. kamieninėms ląstelėms diferenciacijos proceso metu, tiek vėžinėms ląstelėms naviko vystymosi ar metastazių formavimosi procesuose (Sunyer *et al.*, 2012). Užląstelinės aplinkos kietumas taip pat atlieka svarbų vaidmenį skatinant ar slopinant ląstelių išlikimo signalus – anksčiau mūsų skyriuje atlikti MCF-7 ląstelių tyrimai parodė, kad ląstelės geriau dauginasi ant vidutinio ir didelio kietumo gelių (8 ir 40 kPa), lyginant su minkštais geliais (1 kPa) (Jasmontaitė, 2019). Mitogenu aktyvuojamų baltymų kinazių (MAPK) šeimos baltymai yra svarbūs viduląstelių procesų dalyviai, galintys skatinti tiek ląstelės išlikimą, tiek žūtį, Pastaraisiais metais atlikti tyrimai parodė, kad MAPK gali daryti įtaką ir mechanotransdukcijos signalinių kelių vyksmui, pvz. N-terminalinės c-Jun kinazės (JNK) ir p38 raiškos lygis gali reuliuoti *Yes* asocijuoto baltymo (YAP) raiškos lygį (Liu *et al.*, 2020). Transkripcijos veiksnys c-Jun, kurio pagrindinis reguliatorius yra JNK, yra svarbus taikinytis galintis susiprinti vėžinių ląstelių jautrumą chemoterapiniams poveikiams. Jo aktyvumą gali reguliuoti ir kitų MAP kinazių signaliniai keliai, pvz. ERK. Todėl šiame darbe siekėme įvertinti ar c-Jun baltymo lygio pokyčiai gali turėti įtakos krūties vėžio ląstelių išlikimui skirtingo kietumo aplinkose.

## **Tikslas ir uždaviniai**

**Darbo tikslas** – įvertinti transkripcijos veiksnio c-Jun vaidmenį krūties vėžio MCF-7 linijos ląstelėms atsakant į doksorubicino ir aplinkos kietumo pokyčius

### **Uždaviniai:**

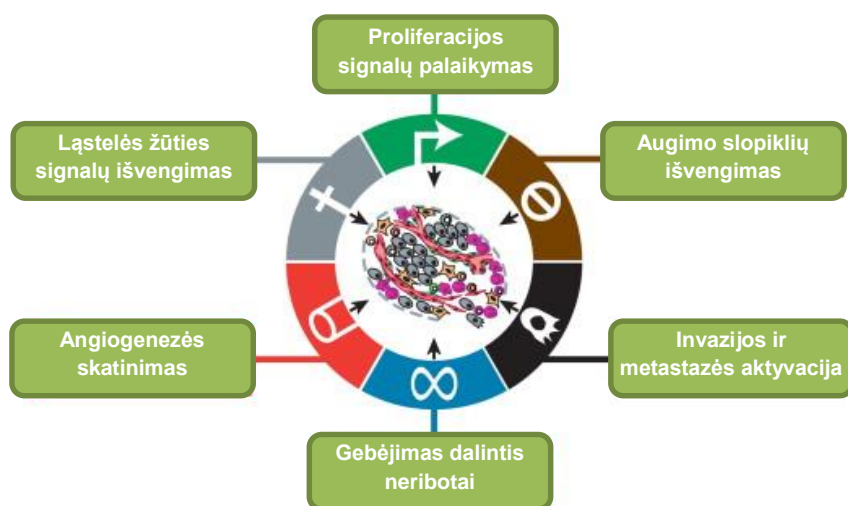
- Panaudojant virusinį vektorių su priešprasmine c-Jun seka, gauti MCF-7 linijos ląsteles su sumažintu c-Jun baltymo lygiu.
- Palyginti kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių savybes (adheziją ir proliferaciją) ant skirtingo kietumo paviršių.
- Ištirti doksorubicino poveikį kontrolinėms ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelėms, auginamos ant skirtingo kietumo paviršių.
- Įvertinti sutelktinio sąlyčio taškų kiekį kontrolinėse ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelėse, auginamose ant 8 kPa hidrogelio.

# 1. LITERATŪRINĖ APŽVALGA

## 1.1 Vėžys ir jį lemiantys veiksniai

Vėžys – tai liga, išsivystanti dėl nenutrūkstamos ir nereguliuojamos ląstelių proliferacijos. Kitaip nei normalios audinio ląstelės, vėžinės ląstelės nereaguoja į signalus, kontroliuojančius normalių ląstelių elgseną, jos auga ir dalijasi nekontroliuojamai, įgyja judrumą, įsiveržia į normalius audinius ir organus, kol galiausiai pradeda plisti po visą organizmą. Nereguliuojamas vėžinių ląstelių augimas yra nulemiamas susikaupusių anomalijų įvairiose ląstelės reguliacijos sistemose. Aktyviai proliferuojančios ląstelės gali suformuoti auglius bet kuriame organizmo audinyje (Cooper, 2000).

Pagal Hanahan ir Weinberg (2011), vėžio susidarymą lemia 6 vėžinių ląstelių bruožai, įgyti per daugiapakopį žmogaus audinių auglių vystymąsi (1.1 pav.).



1.1 pav. Vėžinių ląstelių bruožai.

### 1.1.1 Nuolatinis proliferacijos signalų palaikymas

Normalūs audiniai subalansuotai reguliuoja augimą skatinančių signalų susidarymą ir paleidimą siekiant palaikyti ląstelių kiekio homeostazę ir taip užtikrinti normalią audinio architektūrą bei funkcijas. Skirtingai nei normalaus audinio ląstelės, vėžinės ląstelėse sutrinka šių signalų reguliacija ir gebėjimas savarankiškai reguliuoti savo likimą. Didžiąją dalį proliferacijos signalų pokyčių lemia augimo veiksniai, kurie jungiasi prie ląstelės paviršiuje esančių receptorių (tipiškai turinčių viduląstelinius tirozino kinazės domenų). Šie receptoriai perduoda signalus į išsišakančius viduląstelinius signalinius kelius, kurie reguliuoja ląstelės

ciklo ir ląstelės augimo (t.y. ląstelė didėja) progresą. Šie signalai taip pat daro įtaką ir kitoms ląstelės biologinėms savybėms – ląstelių išgyvenamumui, energetinei būklei metabolizmui.

### 1.1.2 Apoptozės išvengimas

Jau praeito amžiaus pabaigoje mokslininkai pradėjo tyrinėti **apoptozę**, programuotą ląstelės žūtį, kuri veikia kaip natūralus priešvėžinis barjeras. Tarp apoptozę sukeliančių stresų pavyzdžių vėžinėse ląstelėse – signalinis disbalansas sukeltas padidėjusios onkogenų reikškos ir DNR pažeidimų, susijusių su auglio ląstelių hiperprolifracija. Apoptozės mechanizmas yra įvykių grandinė, kurios pradžioje veikia reguliatoriai, o pabaigoje – vykdomieji komponentai. Apoptozės iniciacija galima dviem būdais: **išorinė apoptozinė programa** – gauna ir apdoroja mirties signalus iš ląstelės išorės, pvz., Fas ligando/Fas receptoriaus kelias; **vidinė apoptozinė programa** – reaguojanti ir veikianti atsakant į viduląstelinės kilmės signalus. Galutinis tiek vidinės, tiek išorinės apoptozės programos etapas – proteazėms priklausančių baltymų – kaspazių aktyvacija, sukelianti laipsnišką apoptuojančios ląstelės fragmentaciją (Hannahan & Weinberg, 2011).

Skirtingai nei normalios ląstelės, vėžinės ląstelės egzistuoja nuolatinio streso būsenoje – onkogeninio streso, genominio nestabilumo, hipoksijos sąlygomis. Normaliai funkcionuojant ląstelei, tokiomis sąlygomis būtų aktyvuojama apoptozės programa, tačiau vėžinės ląstelės dažnai geba jos išvengti išjungdamos apoptozės signalinius kelius (Fernand & Kurokawa, 2013).

Vėžinės ląstelės gali daryti įtaką apoptoziniams signaliniams keliams per transkripciją, translaciją ir po translacijos. Daugeliu atvejų, vėžinės ląstelės išvengia apoptozės didindamos anti-apoptozinių ir mažindamos pro-apoptozinių genų reikškę. Be to, gali būti stabilizuojančiai veikiami anti-apoptoziniai ar destabilizuojami pro-apoptoziniai baltymai. Dar vienas galimas apoptozės išvengimo būdas vėžinėse ląstelėse – anti- ir pro- apoptozinių baltymų funkcijos pakeitimas per potransliacines modifikacijas, tokias kaip fosforilinimas. Vėžinėse ląstelėse gali veikti vienas ar keli mechanizmai, kuriais jos išvengia apoptozės (Fernand & Kurokawa, 2013).

### 1.1.3 Augimo slopiklių išvengimas

Be gebėjimo sukelti ir išlaikyti teigiamai veikiančius augimą skatinančius signalus, vėžinės ląstelės taip pat turi įveikti galingas ląstelės programas, kurios neigiamai veikia proliferaciją. Daugelis šių programų yra priklausomos nuo auglio supresorių genų. Auglių supresuojantys genai veikia įvairiais mechanizmais, kurių tikslas riboti ląstelės augimą ir



prolifraciją. Daug šių genų buvo atrasta dėka charakteringos jų inaktyvacijos skirtingose vėžio formose žmoguje ar kituose gyvūnuose. Du svarbūs auglio supresorių genai koduoja baltymus RB (angl. *retinoblastoma-associated*) ir P53. Šie baltymai yra pagrindiniai dalyviai dviejuose vienas kitą papildančiuose reguliaciniuose mechanizmuose, kurie valdo ląstelės likimą – leisti ląstelei toliau proliferuoti ar aktyvuoti senėjimo / apoptozės programas.

#### 1.1.4 Invazijos ir metastazių aktyvacija

Pastebėta, kad vėžinės ląstelės pereidamos į aukštesnį piktybiškumo lygmenį keičia savo formą ir sukibimą su kitomis ląstelėmis bei užląsteline erdve (ekstraląstelinu matriksu, ECM). Geriausiai išanalizuotas atvejis, susijęs su metastazėmis ir invaziškumu yra E-kadherino netekimas karcinomos ląstelėse. E-kadherinas – svarbi tarpląstelinės sąveikos molekulė: šis baltymas formuoja jungtis tarp šalia esančių epitelinių ląstelių ir epiteliniame audinyje išlaiko ląsteles jų vietoje. Padidėjusi E-kadherino raiška veikia antagonistiskai invazijai ir metastazėms, tuo tarpu sumažėjusi raiška sustiprina šiuos fenotipus. Pastebėta, kad žmogaus karcinomoms būdinga E-kadheriną inaktyvuojančios mutacijos (Berx and van Roy, 2009, Cavallaro and Christofori, 2004). Taip pat pastebėta, kad daugelyje didelio agresyvumo karcinomų pakinta ir kitų tarpląstelinės sąveikos bei ląstelių sąveikos su užląsteline erdve adhezijos molekulių raiška. Be to, dažnai būna padidėjusi ir raiška molekulių, kurios normaliai yra susijusios su ląstelių migracija, vykstančia embriogenezės metu ir esant uždegimui. Pavyzdžiui, N-kadherinas, kuris normaliai yra reiškiamas migruojančiuose neuronuose ir mezenchiminėse ląstelėse organogenezės metu, yra stipriau reiškiamas daugelyje invaziškų karcinomos ląstelių.

#### 1.1.5 Gebėjimas dalintis neribotai

Apie 2000-uosius metus buvo plačiai pripažinta, kad vėžinėms ląstelėms reikalingas neriboto dalijimosi potencialas, dėl kurio jos geba suformuoti makroskopinius auglius, tuo tarpu normaliai funkcionuojančios kūno ląstelės turi ribotą augimo ir dalijimosi ciklą skaičių. Šis ribojimas yra susijęs su dviem proliferacijos barjeriais:

- **senėjimu** – įprastas ir negrįžtamas ląstelės įėjimas į neproliferuojančią, bet gyvybingą būseną;
- **ląstelės krizė** – ląstelės būseną vedanti į žūtį.

Kai ląstelės dauginasi kultūroje, pasikartojantys ląstelių dalijimosi ciklai iš pradžių ląsteles veda į senėjimą, o tos ląstelės, kurios sugeba įveikti senėjimo barjerą pereina į krizės

stadiją – šioje stadijoje didžioji dalis ląstelių miršta. Retais atvejais krizę patiriančių ląstelių populiacijoje atsiranda tokių, kurios turi neriboto dalijimosi potencialą. Šis reiškinys yra vadinamas **imortalizacija** – ląstelių savybė proliferuoti kultūroje be senėjimo ar krizės vyksmo.

Surinkta įrodymų, kad telomeros, kurios apsaugo chromosomų galus, atlieka pagrindinį vaidmenį neriboto dalijimosi procese. Paprastai telomeros, kurios yra sudarytos iš pasikartojančių heksanukleotidų sekų, su laiku neimortalizuotose ląstelėse trumpėja ir praranda gebėjimą apsaugoti chromosominę DNR nuo chromosomų galų susijungimo. Tokie chromosomų galų susijungimai sukuria nestabilias dicentrines chromosomas ir kelia grėsmę ląstelės išgyvenimui. Dėl šios priežasties telomerinės DNR ilgis ląstelėje nulemia kiek sėkmingų pasidalijimų ląstelė gali įgyvendinti, iki kol telomeros tampa smarkiai sutrumpėjusios ir nebegalinčios atlikti savo apsauginės funkcijos – tai sukelia krizės būseną.

**Telomerazė** – specializuota DNR polimerazė, kuri prideda telomeros pasikartojimų segmentus telomerinės DNR galuose. Šio fermento beveik nėra neimortalizuotose ląstelėse, bet jo raiškos lygis yra funkciškai reikšmingas didžiojoje daugumoje (~90%) spontaniškai imortalizuotų ląstelių, tarp jų ir žmogaus vėžio ląstelės. Pratęsdama telomerinę DNR, telomerazė kompensuoja telomerų nykimą, kuris savaime vykėtų nesant šiam fermentui. Esant telomerazės aktyvumui, tiek spontaniškai imortalizuotose ląstelėse, tiek genų inžinerijos būdu gautose, telomerazę reiškiančiose ląstelėse, pastebimas atsparumas senėjimui ir krizei/apoptozei. Tuo tarpu telomerazės nuslopinimas veda į telomerų trumpėjimą ir galiausiai į vieną iš proliferacijos barjerų.

Du proliferacijos barjerai – senėjimas ir krizė/apoptozė – yra esminė priešvėžinė apsauga, panaudojama sustabdyti preneoplastinių ar jau neoplastinių ląstelių darinių formavimąsi. Daugelyje pradinių neoplazinių darinių ląstelės išėikvoja gebėjimą pakartotinai dalintis ir pasiekia vieną iš proliferacijos barjerų. Vis dėlto, retais atvejais neoplastiniuose dariniuose atsiranda imortalizuotų ląstelių variantų, kurie dažniausiai susidaro dėka padidintos telomerazės raiškos arba retesniu atveju per alternatyvų, rekombinacija grįstą telomerų palaikymo mechanizmą. Tad įprastai telomerų trumpėjimas yra mechanizmas, kuris apsprendžia normaliai funkcionuojančių ląstelių gyvavimo trukmę ir taip pat yra kliūtis vėžinėms ląstelėms susidaryti.

### 1.1.6 Angiogenezės skatinimas

Kaip ir normaliai funkcionuojantiems audiniams, augliams reikia palaikyti maisto medžiagų ir deguonies tiekimą bei šalinti metabolineis atliekas bei anglies dioksidą. Embriogenezės metu, organizme vystantis kraujagyslių sistemai, vyksta du pagrindiniai procesai: **vaskulogenezė** – naujų kraujagyslių susidarymas, **angiogenezė** – atšakų formavimas nuo jau egzistuojančių kraujagyslių. Pilnai susiformavusi kraujagyslių sistema didžiąja dalimi pereina į ramybės būseną ir tampa struktūriškai stabili. Normaliai funkcionuojančiame suaugusiojo organizme angiogenezės procesas trumpalaikiškai įjungiamas žaizdų gyjimo ar moters reprodukcinio ciklo metu, tuo tarpu progresuojančiame auglyje angiogenezės procesas yra beveik nuolat aktyvus ir taip skatina kraujagyslių sistemą be sustojimo formuoti naujas kraujagyslių atšakas, kad būtų palaikomas didėjančio neoplastinio darinio gyvybingumas.

Daugelis angiogenezės reguliatorių yra signaliniai baltymai, kurie jungiasi prie stimuluojančių ar slopinančių ląstelės paviršiaus receptorių, išsidėsčiusių ant kraujagyslės endotelio ląstelių. Gerai žinomi angiogenezę skatinantys ir slopinantys veiksniai yra atitinkamai kraujagyslių endotelio augimo veiksnys A (angl. *vascular endothelial growth factor-A*, VEGF-A) ir trombospondinas 1 (angl. *thrombospondin-1*, TSP-1). VEGF-A genas koduoja ligandus, kurie dalyvauja naujų kraujagyslių susidarymo reguliavime tiek embriono vystymosi laikotarpiu, tiek ir po gimimo. VEGF signalai siunčiami per 3 receptorines tirozino kinazes (VEGFR-1-3), yra valdomi ir dalyvauja sudėtinguose ląstelės valdymo keliuose. VEGF geno raiška gali būti padidinta dėl hipoksijos ar onkogenų signalų. Taip pat, nustatyta, kad VEGF ligandai gali būti izoliuojami užląstelinėje erdvėje latentinėje formoje, kuri gali būti išlaisvinta ir aktyvuota užląstelinę erdvę degraduojančių proteazių, pvz MMP-9. Yra pastebėta ir kitų proangiogeninių signalų, susijusių su fibroblastų augimo veiksnių (FGF) šeimos atstovais. FGF buvo susieti su auglio angiogenezės palaikymu pastebėjus, kad šios šeimos baltymų raiška vėžinėse ląstelėse chroniškai padidinta.

TSP-1, kaip atsvara angiogenezės įjungimui, taip pat jungiasi prie transmembraninių receptorių, esančių endotelinėse ląstelėse, ir sukelia slopinančius signalus, galinčius konkuruoti su proangiogeniniais stimulais. Dėl chroniškai aktyvuotos angiogenezės ir nesubalansuotų proangiogeninių signalų mišinio, auglyje besiformuojančios kraujagyslės dažnai būna pakitusios: per intensyvus kraujagyslių išsišakojimas, išsikraipiusios ar per didelės kraujagyslės, lemiančios nepastovią kraujo tėkmę, mikrokraujavimą, nenormalų endotelinių ląstelių proliferacijos ir apoptozės lygį. Daugiapakopiame invazinių vėžinių

ląstelių vystymesi angiogenezė sužadinama stebėtinai anksti, tai pastebėta tiek gyvūnų modeliuose, tiek ir žmonėse. Histologinėse priešpiktybinių, neinvazinių pažeidimų (tarp jų displazijos ir *in situ* karcinomos įvairiuose organuose) analizėse jau gali būti aptinkamas angiogenezės įjungimas (Hannahan & Weinberg, 2011).

## 1.2 Krūties vėžys

### 1.2.1 Krūties vėžio tipai

Krūties vėžys iki šiol yra labiausiai paplitęs vėžys tarp moterų. 2018 metais buvo nustatyta 2 mln naujų vėžio atvejų (23% tų metų vėžinių susirgimų) ir užima 2-ąją vietą tarp visų vėžinių susirgimų (10,9%) (Zaidi & Dib, 2019). Histologiškai dažniausia piktybinė krūties vėžio forma – adenokarcinomos, kurios lemia apie 95% visų krūties vėžio atvejų, tarp kurių apie 55% atvejų yra diagnozuojama invazinė duktalinė karcinoma (IDC) (Makki, 2015).

Vienas iš pagrindinių iššūkių gydant šią vėžio formą yra heterogeniška prigimtis, nulemianti terapijos pasirinkimus. Krūties vėžio atveju įvertinami keli biožymenys, tokie kaip hormonų receptorių (HRs) buvimas, perteklinė žmogaus epidermio augimo veiksnio receptoriaus 2 (HER2) raiška ir/arba papildomos *HER2* geno kopijos. Pagal šiuos biožymenis išskiriami pagrindiniai krūties vėžio subtipai: 1) luminalinis A (HR+/HER-), 2) HER2+, luminalinis B (HR+/HER2+) ir trigubai neigiamas (TNBC; HR-/HER2-) (Tong *et al.*, 2018, Lee *et al.*, 2015).

Visi šie subtipai turi skirtingą pasireiškimo dažnį, atsaką į terapiją, ligos progresiją ir metastazių taikinius organus. Luminalinis krūties vėžys yra HR teigiamas – aptinkami estrogeno ir progesterono receptoriai. Luminalinio A krūties vėžio subgrupė (HR+/HER-) įprastai auga lėtai ir yra mažiau agresyvi nei kiti krūties vėžio subtipai, labiau jautri hormoninės terapijos poveikiui. Luminalinis B krūties vėžys (HR+/HER2+) identifikuojamas pagal aukštą proliferacijos markerio Ki67 ar HER2 raišką ir turi prastesnę išgyvenamumo prognozę nei luminalinio A atveju. HER2+ pasižymi onkogeno *HER2/ERBB2* padidinta raiška ar padidintu kopijų skaičiumi ir gali būti gydomi anti-HER2 terapija. Į bazalines ląsteles panašus (angl. *basal-like*) krūties vėžys nepasižymi nei HR, nei HER2 raiška, todėl yra priskiriamas trigubai neigiamai krūties vėžio (TNBC) subgrupei. Labiausiai paplitę yra HR+ subtipai, kurie sudaro apie 83% visų krūties vėžio atvejų (iš jų 71% luminalinis A, 12% - luminalinis B), 12% visų atvejų sudaro TNBC ir tik 5% visų atvejų yra HR-/HER2+ (Tong *et al.*, 2018).

## 1.2.2 Krūties vėžio ląstelių linija MCF-7

MCF-7 – plačiai taikoma krūties vėžio ląstelių linija, kuri buvo išskirta 1973 metais dr. Soule grupės, Mičigano vėžio institute (angl. *Michigan Cancer Foundation*, iš originalo ir kilęs šios ląstelių linijos trumpinys MCF) iš 69 metų amžiaus kaukazoidės. Ši ląstelių linija iki šiol dažnai naudojama įvairių tyrėjų grupių ir yra tinkamas ląstelių modelis krūties vėžio tyrimams pasauliniu mastu, jų tarpe – priešvėžinių vaistų paieškos tyrimams. (Comşa *et al.*, 2015).

MCF-7 ląstelių bruožai, pagal Comşa *et al.* (2015) ir Welsh (2013):

- MCF-7 ląstelės priskiriamos ER-pozityviam, luminaliniam A subtipui;
- MCF-7 ląstelių linija yra mažai agresyvi ir neinvazinė, įprastai laikoma turinti mažą metastazinį potencialą;
- Populiacija fenotipiškai heterogeniška;
- Būdinga aneuploidija ir genetinis nestabilumas.

Vienas iš svarbiausių MCF-7 panaudojimų yra estrogeno receptoriaus alfa (ER $\alpha$ ) studijose, kadangi ši ląstelių linija yra viena iš nedaugelio, kurioje yra stipri ER raiška – ši savybė pamėgdžioja daugelį invazyvių krūties vėžio formų, kuriose reiškiamas ER. Verta paminėti, kad palaikyti ER $\alpha$  raišką kultivuojamose ląstelėse yra sudėtinga, todėl dauguma tyrimams naudojamų krūties vėžio ląstelių linijų yra ER neigiamos (Lee *et al.*, 2015, Subik *et al.*, 2010). MCF-7 ląstelės plačiai taikomos ER-pozityvių krūties vėžio ląstelių eksperimentuose, daug dėmesio kreipiant į tyrimus, susijusius su įgytu anti-estrogeno vaistų atsparumu (Seibert *et al.*, 1983; Zhou *et al.*, 2012; MacGregor Schafer & Jordan, 2006). Šios ląstelės gerai tinka anti-hormonų terapijos atsparumo tyrimams, nes jos yra lengvai kultivuojamos ir išlaikančios ER ekspresiją. Siekiant tirti skirtingus įgyto anti-hormonų atsparumo krūties vėžio ląstelėse atvejus, MCF-7 ląstelės adaptuotos įvairiose anti-hormonų poveikio aplinkose (Comşa *et al.*, 2015).

Nors MCF-7 buvo laikoma vientisa ląstelių linija, išties ją sudaro daug individualių fenotipų (Leung *et al.*, 2010). Vis dėlto, daugelis jų tesudaro nedideles bendros populiacijos dalis (Comşa *et al.*, 2015; Welsh, 2013). Individualūs fenotipai gali skirtis genų ekspresijos profiliu, receptorių ekspresija ar signaliniais keliais. Nepaisant galimų skirtumų proliferacijos lygmenyje, išlaikomas daugybinių fenotipų balansas, galimai per signalinių kelių kooperaciją. Mažų MCF-7 sublinijų egzistavimas tėvinėje linijoje gali atsiskleisti esant tinkamoms selekcijos sąlygoms. Šioms ląstelėms būdinga aneuploidija – chromosomų skaičiaus variacija gali būti nuo 60 iki 140. Kiti citogenetiniai skirtumai apsprendžiami specifinių chromosomų-

žymenų buvimu ar trūkumu. MCF-7 pasižymi genetiniu nestabilumu, tačiau kariotipiniai pokyčiai gali būti nulemti atrankos spaudimo pokyčių skirtingomis kultivavimo sąlygomis. MCF-7 taip pat turi populiaciją kamieninių ląstelių, galinčių kurti kloninį variabilumą (Comşa *et al.*, 2015). Taigi, šiai ląstelių linijai yra būdingas heterogeniškumas, todėl MCF-7 ląstelių linija gali būti pritaikoma kaip krūties vėžio modelis, mėgdžiojantis besiformuojančio auglio heterogeniškumą organizme (Leung *et al.*, 2010). *In vitro* MCF-7 modeliai pasistūmėjo tolyn klinikinėje praktikoje, kai buvo adaptuoti *in vivo* modeliams, kurie labiau atspindi tikrąjį ligos progresą. *In vivo* modeliais sukuriama galimybė tirti, kaip vyksta vėžinių ląstelių tarpusavio sąveika, angiogenezė, ląstelinis metabolizmas ir kvėpavimas – procesai, kurių ląstelių kultūrų sąlygomis nėra galimybės ištirti (Comşa *et al.*, 2015).

MCF-7 yra estrogenui (E2) jautrios krūties vėžio ląstelės, kurių proliferacija yra priklausoma nuo E2. Jose yra aukšto lygio *ERα* transkriptų raiška, bet žema raiška *ERβ*. Vis dėlto, kai kurie autoriai mini, kad ER raiška yra silpna tėvinėje linijoje, lyginant su tamoxifen atspariomis sublinijomis (Baguley & Leung, 2010), kiti parodė, kad MCF-7 turi didelius kiekius 17β-estradiolio receptorių (Brooks *et al.*, 1973). Iš kitos pusės, PR ekspresija yra stipri tėvinėje linijoje, bet silpna ar visai neišreikšta tamoxifen atspariose MCF-7 ląstelėse (Baguley & Leung, 2010). MCF-7 ląstelėse ER raiška padidėja nesant estrogenų. Trumpalaikis estrogeno trūkumas sukelia skirtingą atsaką lyginant su ląstelėmis, kurios patyrė ilgalaikį estrogeno trūkumą (virš 6 mėnesių). Sumažėjusios proliferacijos lygis išsilaiko apie mėnesį po estrogeno pašalinimo – galima manyti, kad maždaug tiek laiko ląstelėms užtrunka išvystyti adaptacinius ar kompensacijos augimo mechanizmus. Vis dėlto, MCF-7 ląstelių augimo skirtumai E2 poveikyje yra sukelti ne ER raiškos skirtumų, jų augimo atsakas į E2 siejamas su autokrininių veiksnių sekrecija, kuri aktyvuoja IGF-IR (Hamelers *et al.*, 2003). Krūties vėžio ląstelių augimas reguliuojamas ne tik ER ir PR, bet ir su plazmine membrana asocijuotų augimo veiksnių receptorių. Du ypač svarbūs dalyviai šioje didelėje baltymų šeimoje yra EGFR, kuris yra aktyvuojamas EGF ir HER2. Tiek EGFR, tiek HER2 yra aptinkami MCF-7 ląstelėse. Vis dėlto, MCF-7 laikoma vidutiniškai EGFR reiškiančia ląstelių linija.

Santykinė ER, PR ir HER2 raiška gali būti labai įvairi tarp skirtingų MCF-7 sublinijų. Dominuojantį fenotipą kultūroje lemia auginimo sąlygos: ER-pozityvios sublinijos dominavimą lemia mažas estrogeno kiekis naudojamame FBS. Vis dėlto, prailgintas auginimas nesant estrogeno atrinktų variantus, kuriuose padidėjusi EGFR, HER2 ir kitų signalinių kelių stimuliatorių raiška. Įdomu tai, kad ER-, PR- ir HER2-negatyvios (trigubo negatyvumo) sublinijos taip pat galimai kilusios iš ER+ MCF-7 ląstelių. Tai gali būti

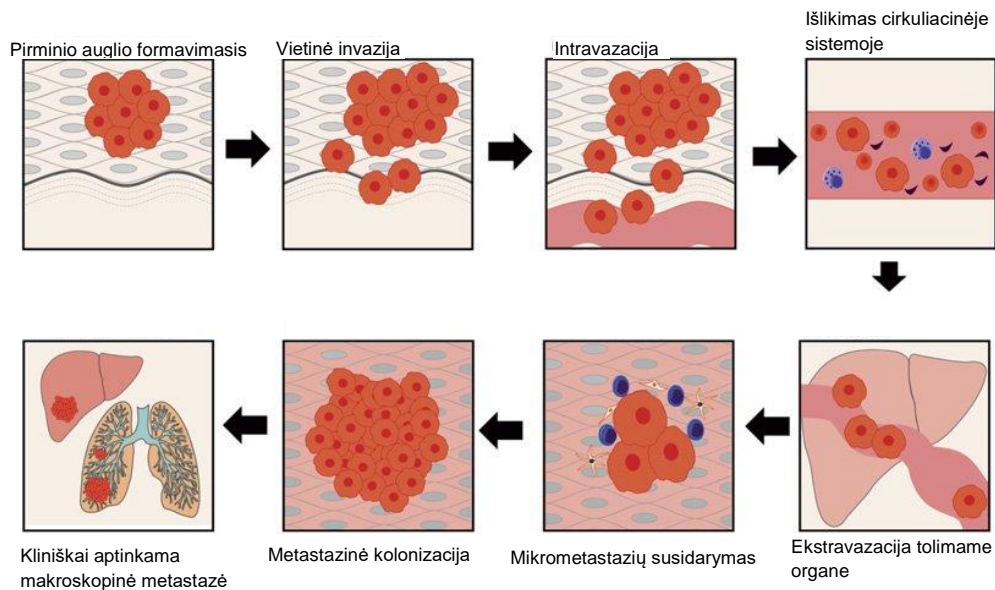
naudingas modelis geresniam trigubai neigiamo krūties vėžio supratimui klinikinėje praktikoje – galėtų padėti aiškinantis daugybės fenotipų susidarymą iš vieno tipo ląstelių klinikinio vėžio atvejais.

MCF-7 pasižymi diferencijuoto epitelio požymiais: šios ląstelės turi epitelio žymenis, tokius kaip E-kadherinas,  $\beta$ -kateninas ir citokeratinas 18 (CK18), ir neigiamos pagal mezenchiminius markerius, tokius kaip vimentinas ir lygiųjų raumenų aktinas (SMA). Taip pat MCF-7 ląstelės išlaiko raišką žymenų, būdingų natūraliems epiteliniams audiniams, pvz. klaudinai ir ZO-1. Taip pat ir kitų baltymų, kurie sudaro tarpląstelines jungtis. Be to MCF-7 ląstelės neturi žymens CD-44, kuris aptiktas kai kuriose krūties vėžio ląstelių linijose ir yra siejamas su ląstelių kamieniškumu (Basakran, 2015). MCF-7 ląstelės nereikia GHRHR baltymų ir tokiu būdu reprezentuoja naudingą sistemą, kuri leistų stebėti šių receptorių raiškos stimulų efektus. Įdomu, kad ląstelių augimo kontrolės genas RAC3 turi minimalų efektą MCF-7 ląstelėse, nepaisant to, kad aktyvuojamos užtraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės (ERK). Tai gali būti paaiškinama faktu, kad signalinis kelias negali būti pilnai efektyvus, nes šiose ląstelėse yra neaktyvi branduolio veiksnio  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) baltymų DNR transkripcijos kontrolė (Comşa *et al.*, 2015).

### 1.3 Vėžio metastazės

Vėžio metastazės – tai vėžio ląstelių išplitimas iš auglio kilmės vietos į kitus audinius ir organus, lydymas naujų auglių formavimosi. Metastazės yra pagrindinė vėžio pacientų mirties priežastis. Šis procesas yra sudarytas iš vienas po kito sekančių įvykių, kurie turi būti įvykdyti, jog vėžinė ląstelė galėtų sėkmingai metastazuoti - tai vadinama metastazine kaskada (Martin *et al.*, 2013; Seyfried & Huysentruyt, 2013). Metastazinės kaskados metu kinta tarpląstelių sąveikų bei ląstelės-matrikso adhezijos stiprumas.

Metastazinė kaskada skirstoma į 3 pagrindinius etapus: **invazija, intravazacija ir ekstravazacija** (1.2 pav.).



**1.2 pav. Metastazinė kaskada.** Ląstelės-ląstelės adhezijos netekimas leidžia piktybinėms ląstelėms disocijuoti nuo pirminės auglio masės, o pokyčiai ląstelės-matrikso sąveikoje leidžia ląstelėms veržtis į aplinkui auglį esančią stromą – tai invazijos etapas. Invazijos metu išskiriamos medžiagos, kurios degraduoja pamatinę membraną ir užląstelinį matriksą, taip pat kinta raiška baltymų, dalyvaujančių ląstelių judrumo ir migracijoje. Antrajam etapui, intravazacijai, svarbus angiogenezės procesas – auglio kraujagyslių tinklo formavimas suteikia metastazuojančioms ląstelėms galimybę patekti į bendrą kūno kraujotakos sistemą ir nukeliauti į tolimas organizmo vietas. Intravazacijos etapą pasiekusi auglio ląstelė kraujagyslėse sąveikauja su endotelio ląstelėmis silpnais ryšiais. Galiausiai įvyksta trečiasis etapas, ekstravazacija: susidaro tvirta vėžinės-endotelio ląstelių adhezija, vėžinė ląstelė prasiskverbia per endotelį ir pamatinę membraną. Tokiu būdu auglio ląstelės prasiskverbia į naują audinį, kuriame gali formuoti antrinį vėžio židinį (Martin *et al.*, 2013; Pachmayr *et al.*, 2017).

Ankstyvojoje stadijoje, vėžinės ląstelės yra izoliuotos pirminiame auglyje, kuris yra ribojamas jį supančių audinių. Ligai progresuojant, dėl genetinių/epigenetinių polinkių, aplinkos sąveikos/stumuliacijos ar šių abiejų priežasčių kartu, dalis vėžinių ląstelių auglyje tampa labiau agresyvios ir pralaužia aplinkinę struktūrą. Tokios ląstelės arba tiesiogiai veržiasi į aplinkui auglį esantį audinį, arba pasklinda per limfinę ar kraujo sistemą. Tiesioginė audinio invazija gali nulemti vėžio plitimą į šalia esančius audinius ar organus, tuo tarpu limfatiniai ir kraujagyslių keliai nuneša vėžines ląsteles iš pirminės auglio vietos į tolimus organus. Tiek limfatinis, tiek hematogeninis plitimas dažnai aptinkamas pažengusio vėžio pacientuose, tačiau gali vykti ir ankstyvose vėžio stadijose. Metastazės procesas sudėtingas, jame dalyvauja daug ląstelių, veiksnių. Vystantis ir progresuojant pirminiam augliui, tam tikri jame esantys klonai gali turėti reikiamas genotipines ir fenotipines charakteristikas, leidžiančias sąveikauti su vietine mikroaplinka (Martin *et al.*, 2013).

Vėžio metastazės yra auglio piktybiškumo požymis, kuris prasideda procesu, vadinamu **epiteline-mezenchimine tranzicija (EMT)**. Jo metu poliarizuotos epitelinės ląstelės tampa



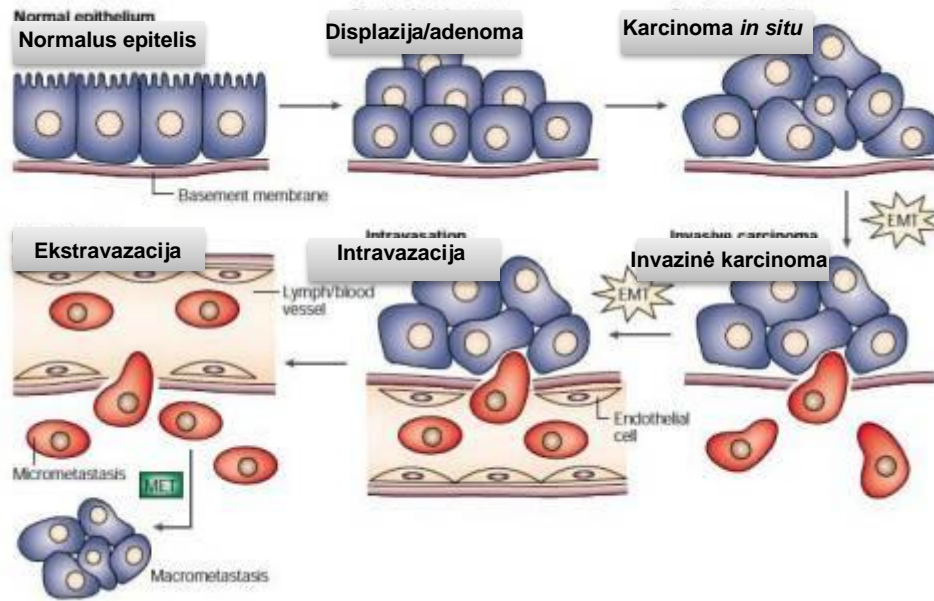
nepoliarizuotomis mezenchiminėmis ląstelėmis, kurios pasižymi padidintu judrumu ir invazyvumu (Thiery, 2002; Pal *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2017). Apie 90% su vėžiu susijusių mirčių yra lemiamos metastazių. Epitelinės ląstelės patiriančios EMT įgyja į vėžines kamienines ląsteles (CSC) panašų fenotipą ir geba formuoti naujus auglius (Pal *et al.*, 2019).

EMT programa susijusi su piktybiškumu, invazija ir metastazėmis dar vadinama EMT tipu 3, kad būtų atskirta nuo EMT, susijusios su embriogeneze (tipas 1), ir audinio regeneracija (tipas 2) (Fedele *et al.*, 2017).

E-kadherinas yra labai svarbus epitelinis markeris, kuris suteikia ląstelėms epitelinį fenotipą, tuo tarpu E-kadherino netekimas sukelia EMT. E-kadherinas gali būti nuslopintas dėl įvairių transkripcijos veiksnių veiklos. Transkripcijos veiksniai - Snail 1 ir Snail 2 (dar žinomas kaip Slug), ZEB1, ZEB2, į Kruppel panašus veiksnys 8 (KLF8), Twist, limfoidinį enhancerį prisijungiantis veiksnys-1 (LEF-1) ir fork-head box baltymas C2 (FOXC2) - gali prisijungti prie E-kadherino promotoriaus ir slopinti jo transkripciją tiesiogiai ar netiesiogiai (Lee *et al.*, 2017).

Jean Paul Thiery pateikė išsamią apžvalgą kaip EMT galėtų dalyvauti metastazėse, vienoje iš publikacijos iliustracijų apibendrintai parodytas EMT vaidmuo karcinomos metastazių susidarymo eigoje (1.3 pav.) (Thiery, 2002).

EMT mechanizmo aiškinimu bandyta surasti analogiją tarp normalių ląstelių elgesio metazoinės morfogenezės metu ir vėžinių ląstelių elgesio auglio progresijoje. EMT adaptacija į vėžinių genų teoriją pasiūlė idėją, kad metastazės yra genominių pakitimų ir kloninės atrankos serijų pabaigos taškas. Vis dėlto, sunku suprasti, kaip genų mutacijų rinkinys, iš kurio daugelis mutacijų yra atsitiktinės ir žalingos, galėtų sukurti ląsteles gebančias sėkmingai pereiti visus metastazės etapus (Seyfried & Huysentruyt, 2013). EMT kelia mokslininkų susidomėjimą siekiant šį procesą lemiančius komponentus panaudoti kaip taikinį priešvėžinei terapijai, tačiau reikalinga surinkti daugiau žinių apie EMT vaidmenį metastazės procese, jo valdymą ir reversiją (Roche, 2018).



**1.3 pav. EMT ir MET karcinomos progresijoje.** Normaliame epitelyje, ribojamame pagrindo membranos, gali susidaryti lokalūs proliferuojančios adenomos židiniai. Tolesnė transformacija vykstanti dėl epigenetinių ir genetinių pokyčių lemia karcinomos susidarymą *in situ*, ląstelės vis dar ribojamos pagrindo membranos. Tolesni ląstelių pokyčiai gali sukelti vietinį karcinomos ląstelių išplitimą, galimai per EMT. Įvykus pagrindo membranos fragmentacijai, ląstelės gali prasiskverbti į limfinę ar kraujo sistemą (intravazacija), kurioje jos transportuojamos į tolimus organus. Pavienės karcinomos ląstelės ekstravazacijos būdu patekusios į naujus audinius, gali išlikti pavienės ir sudaryti mikrometastazes, arba gali formuoti naują karcinomą vėl tapdamos į epitelines panašias ląsteles per EMT atvirkštinį procesą – mezenchiminę-epitelinę tranziciją (MET). (Thiery, 2002)

### 1.3.1 Metastazes skatinantys veiksniai

Genai, skatinantys ląstelės judrumą, EMT, ECM degradaciją, angiogenezę ar gebėjimą išvengti imuninės sistemos yra apibūdinami kaip metastazių iniciacijos genai (Martin *et al.*, 2013).

**TGF- $\beta$  signalai** atlieka svarbų vaidmenį įvairiose ląstelinėse funkcijose ir vystymosi procesuose, tarp kurių geriausiai ištyrinėtas signalinis kelias sužadina EMT. TGF- $\beta$  signalas sukliamamas prisijungus TGF- $\beta$  ligandui prie tipo II ir tipo III receptorių (TGF- $\beta$ RII ir TGF- $\beta$ RIII). Šis įvykis sukelia TGF- $\beta$ R1 surinkimą ir fosforilinimą. Fosforilintas TGF- $\beta$ R1 aktyvuoja įvairius signalinius kelius, tarp jų SMAD2/3, Ras ir PI3K, kurie sužadina EMT sukeliančių transkripcijos veiksnių tokių kaip Snail1/2, Twist ir ZEB1/2 reišką (Martin *et al.*, 2013, Lee *et al.*, 2017). Šie transkripcijos veiksniai gali sukelti tokius efektus kaip E-kadherino raiškos supresiją, p53 baltymo degradaciją, reguliacinės miRNR miR-34 slopinimą ir kt. (Lee *et al.*, 2017).

**Wnt/ $\beta$ -katenino signalai** yra vieni iš pagrindinių signalinių kelių, kurie reguliuoja ląstelių proliferaciją, apoptozę ir EMT, tokiu būdu skatinant vėžio iniciaciją ir progresiją (Lee *et al.*, 2017). Wnt signalams aktyvuoti prie plazminėje membranoje esančių Fzd receptoriaus ir LRP 5/6 koreceptoriaus turi prisijungti Wnt glikoproteinai. Receptoriaus aktyvacija slopina destrukcijos kompleksą Axin2/APC/GSK3 per disheveled (Dsh). Kai Axin2/APC/GSK3 kompleksas yra nuslopintas,  $\beta$ -kateninas gali kauptis citoplazmoje ir persikelti į branduolį. Branduolyje  $\beta$ -kateninas aktyvuoja TCF/LEF šeimos transkripcijos veiksnius, kurie aktyvuoja įvairius Wnt taikininis genus. (El-Sahli *et al.*, 2019). Taikininiais genais dažnai būna ląstelės adhezijos molekulės, kurios skatina CSC susidarymą. Pvz., adhezijos molekulę CD44 koduojantis *CD44* genas yra vienas iš katenino-TCF taikininis genų, kuris lemia CSC bruožų vystymąsi. CD44 padidinta raiška yra CSC žymuo ir susieta su pažengusiomis vėžio vystymosi stadijomis įvairiuose organuose (Basu *et al.*, 2018).

**Notch signalai** svarbūs daugelio ląstelių procesų reguliacijoje - apoptozėje, migracijoje, invazijoje ir angiogenezeje. Sąveika tarp Notch ligando ir transmembraninio receptoriaus sukelia seriją proteolitinių skaldymų, kurie sukelia Notch viduląstelinio domeno (NotchIC) atskėlimą ir translokaciją į branduolį. Branduolyje NotchIC reguliuoja įvairių genų raišką ir tokiu būdu lemia įvairių ląstelės procesų eigą, jų tarpe ir EMT. Normaliose ląstelėse, Notch signalinis kelias dalyvauja specifinio tipo EMT, kuris reikalingas širdies vystymuisi – padidinama SNAIL1 (Snail) raiška endotelinėse ląstelėse. Epitelinėse vėžio ląstelėse, ligando sužadintas Notch signalinis kelias padidina SNAIL2 (Slug) raišką – šis genas koduoja E-kadherino transkripcijos represorių. Kitos Notch signalinio kelio sąsajos su EMT skatinimu yra Snail1, hipoksijos indukuojamo veiksnio  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ) raiškos padidinimas, citoplazminio  $\beta$ -katenino stabilizacija, miR-200 raiškos slopinimas (Lee *et al.*, 2017).

**Hedgehog (Hh) signalinis kelias** yra labai svarbus embriogenezės reguliacijoje ir palaikant suaugusiojo audinių homeostazę, taip pat atlieka vaidmenį ir vėžio vystymuisi. Hh dalyvauja audinių susidaryme ir remodeliavime reguliuodamas Hh-jautrių ląstelių gyvybingumą ir gebėjimą migruoti bei auglio metastazės procese reguliuodamas EMT. Yra žinomi 3 Hh homologai žinduoliuose – Desert (Dhh), Indian (Ihh) ir Sonic (Shh). Geriausiai tarp jų išstudijuotas yra Shh. Pakitusi Shh raiška identifikuota įvairiose vėžio formose (Lee *et al.*, 2017; Skoda *et al.*, 2018). Hh ligandai jungiasi prie ląstelės paviršiuje esančių transmembraninių baltymų, vadinamų Patched homolog 1 (PTCH 1) ir PTCH2, per kuriuos perduodami viduląsteliniai signalai. Nesant Hh ligando, PTCH1 ir 2 neleidžia vykti didelei Smoothened (Smo), 7 kartus ląstelės membraną perveriantis receptorius. Kai už ląstelės ribų yra Hh molekulių, kurios jungiasi prie PTCH1/2, yra aktyvuojamas Smo. Smo aktyvacija

sužadina Gli šeimos TFs, kurie stimuliuoja taikinių genų, tokių kaip SNAIL1, raišką. Hh signalinis kelias taip pat gali netiesiogiai sukelti EMT per Notch, TGF $\beta$  ar miRNR signalinius kelius (Lee et al., 2017).

### 1.3.2 Metastazes slopinantys veiksniai

Metastazių supresorių genai slopina metastazes bet kuriame metastazinės kaskados žingsnyje. Šie genai slopina vėžinių ląstelių metastazes *in vivo* be tumorigeniškumo blokavimo. Yra identifikuota keletas metastazes supresuojančių genų - nemetastazinis genas 23 (NM23), Kangai 1 (KAI1), KISS1, mitogenų aktyvuojamos proteinų kinazė 4 (MKK4), krūties vėžio metastazės supresorius 1 (BRMS1), Rho GDP disociacijos inhibitorius 2 (RhoGDI2), kofaktorius reikalingas Sp1 transkripcijos aktyvacijos subvienetui 3 (CRSP3), vitamino D3 reguliuojamas baltymas 1 (VDUP1). Šių metastazės supresorių genų išreguliavimas buvo aptiktas tam tikro tipo vientisuose augliuose (Martin *et al.*, 2013).

Tarp metastazes slopinančių veiksnių taip pat svarbūs dalyviai yra mikroRNR (miRNR). Tai yra nekoduojančios RNR molekulės, sudarytos iš maždaug 19-25 nukleotidų, kurios gali nuslopinti savo taikinius per iRNR destabilizaciją ir transliacijos slopinimą. Žinomos kelios miRNR, kurios taikosi į EMT transkripcijos veiksnius: miR-200 šeimos nariai, tokie kaip miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429 ir miR-205 sąveikauja su ZEB1/2 ir tokiu būdu slopina EMT procesą (Lee et al., 2017). Kiti miRNR, dalyvaujančių EMT slopinime pavyzdžiai: nustatyta, kad miR-29b slopina prostatos vėžį sumažindamos Snail ir Twist kiekį (Ru et al., 2012), miR-30 slopina TGF- $\beta$ 1 sukeltą hepatocitų migraciją ir neigiamai reguliuoja Snail1 raišką (Zhang et al., 2012), miR-302 ir miR-372 taikosi į TGF- $\beta$ RII ir slopina Slug ekspresiją žmogaus keratinocituose (Subramanyam et al., 2011), miR-204 taikosi į TGF- $\beta$ RII ir palaiko epitelio integralumą tinklainės pigmentiniame epitelyje (Wang et al., 2010). Be to, aptikta įvairių EMT programą veikiančių miRNR, kurios sąveikauja su ląstelės architektūriniais komponentais kaip tvirtosios jungtys, ląstelės-ląstelės adhezija, epitelinės jungtys (Limouille et al., 2013). Individualių miRNR veiksmai reguliuojant EMT gali veikti keliais skirtingais būdais: dvi atskiro tipo miRNR gali kooperuotis reguliuojant vieno EMT komponento raišką, ar vieno tipo miRNR gali kontroliuoti ne vieną EMT signalinio kelio dalyvį (Limouille et al., 2013).

## 1.4 Užląstelinis matriksas

### 1.4.1 Užląstelinio matrikso funkcijos

**Užląstelinis matriksas (ECM)** dažniausiai apibrėžiamas kaip neląstelinis audinio komponentas, kuris suteikia tiek biocheminį, tiek struktūrinį palaikymą ląstelinėms struktūroms (Walker *et al.*, 2018). ECM atlieka ne tik tarpląstelinio užpildo vaidmenį, tačiau yra fiziologiškai aktyvus gyvo audinio komponentas, atsakingas už ląstelių tarpusavio komunikaciją, ląstelių adheziją ir proliferaciją. Fundamentiškai, ECM yra tinkliška struktūra, sudaryta iš vandens, mineralų, proteoglikanų ir fibrilinių baltymų, kurie išskiriami audinio ląstelių. Kiekvienas organas turi unikalią ECM komponentų sudėtį, lemiančią audiniui specifinį ECM vaidmenį. Unikali sudėtis sukurama dėka biofizinio ir biocheminio atsako tarp ląstelių ir jas supančios mikroaplinkos audinio formavimosi metu. Kiekvienam specifiniam audiniui, ECM komponentai sukuriami ir išdėstomi audinio ląstelių priklausomai nuo audinio poreikių. Svarbių fibrilinių baltymų, tokių kaip kolagenas ir lamininas, gamyba yra komtruojama ECM ir yra adaptuojama priklausomai nuo įvairių embrioninio vystymosi stadijų ar ligos progresijos. Kaip labai dinamiška struktūra, ECM yra nuolat pertvarkomas, jos komponentai yra nuolat degraduojami ar modifikuojami. Šiuose procesuose pagrindinį vaidmenį atlieka baltymai – ECM proteinazės. Balansas tarp ECM degradacijos ir sekrecijos yra reguliuojamas ECM modifikuojančių ląstelių, kurios atsakingos už įtempimo homeostazę ir kiekvieno organo savybių, tokių kaip elastiškumas ir spaudimo/tempimo stiprumo, palaikymas. *In vitro* sąlygomis, dauguma ląstelių išlieka gyvybingos tik prikibusios prie substrato. Įvairūs ląsteliniai augimo veiksnų receptoriai ir adhezijos molekulės išsidėsčiusios ląstelės plazminėje membranoje, tokios kaip integrinai, yra atsakingos už ląstelės gebėjimą sukibti ir komunikuoti su ją supančia aplinka. Ląstelės reaguodamos į ECM signalus, tokius kaip erdvinis kontekstas ar mechaninis aplinkos kietumas, koordinuoja savo morfologinę organizaciją ir signalinius įvykius per genų transkripcijos reguliaciją. Šis procesas, kurio metu ląstelė išorinius mechninius stimulus paverčia į viduląstelinį cheminį signalą yra žinomas kaip **mechanotransdukcija**. Ląstelių jautrumo lygis atsakant į biofizikinius ir biocheminius ECM signalus lemia audinio homeostazę, kurios dėka palaikomas normalus jį sudarančių ląstelių funkcionavimas. Esant ECM remodeliavimo reguliacijos sutrikimams, gali pasireikšti įvairių formų audinio fibrozė, kuri charakterizuojama sutankėjusiu ECM ir padidėjusiu audinio kietumu. Sutrikusi audinio homeostazė gali lemti ir vėžio vystymąsi (Walker *et al.*, 2018).

Anksčiau buvo manyta, kad ECM yra kaip inertiškas karkasas, suteikiantis ląstelėms atramą. Dabar žinoma, kad ECM tarnauja kaip sukibimo paviršius, kontroliuojantis ląstelių

adheziją ir migraciją. Taip pat, ECM komponentai gali turėti augimo veiksnių prisijungimo vietas, kurių dėka gali būti kontroliuojamas augimo veiksnių paleidimas ir pristatymas tikslinėms ląstelėms. Be to, ECM perduoda ląstelėms mechaninius stimulus, kurie aktyvuoja kelis viduląstelinius signalinius kelius ir ląstelės citoskeleto aparatą (Walker *et al.*, 2018).

ECM dalyvauja ląstelių migracijoje, šis procesas labai svarbus audinio vystymuisi. Ląstelės migruoja iš regionų, turinčių mažesnę ECM koncentraciją didesnės link. Tai vyksta dėl adhezijos gradiento – toks ląstelės migravimo tipas yra žinomas kaip **haptotaksis**. Vis dėlto, jei ECM koncentracija yra per didelė, ląstelės patiriama adhezijos jėga tampa per didelė joms toliau migruoti. Ląstelės migracija koordinuojama adhezijos ir deadhezijos įvykių sąveikaujant ląstelei su ECM. Proteazės, kurios degraduoja ECM komponentus taip pat tarnauja ląstelių migracijai per procesus, kurių metu vyksta sąveikos su MMPs, adamlizinais, mepriniais, metaloproteinazių inhibitoriais (MMPIs) ir kitais baltymais. Vystymosi metu ECM remodeliavimas vyksta nuolat – komponentai ir jų koncentracijos yra nuolat modifikuojami ir tai diktuoja sąlygas vystymosi programai (Walker *et al.*, 2018).

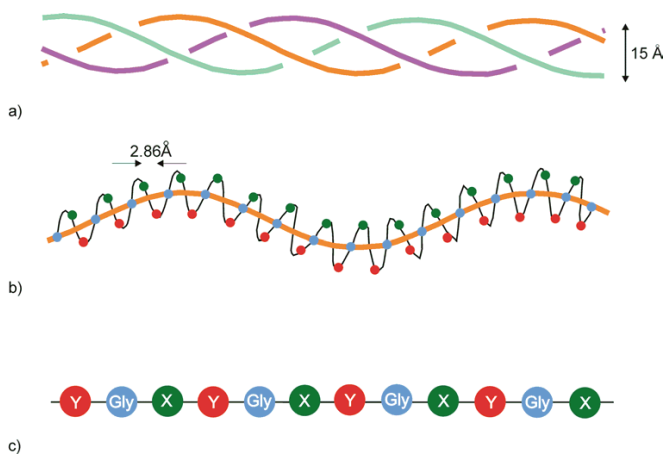
Dėka savo fizikinių savybių, ECM daro įtaką ląstelių lemčiai. Reaguodamos į skirtingo kietumo aplinką, ląstelės gali aktyvuoti skirtingus viduląstelinius signalinius kelius. Pvz., Engler *et al.* parodė, kad kai mezenchiminės kamininės ląstelės (MSC) yra kultivuojamos ant skirtingo elastingumo kolageno paviršiaus, šios ląstelės diferenciuojasi į osteocitus, miocitus ar neuronus ant substratų, kurie savo kietumu buvo panašūs į natūralius organizmo audinius. Gauti rezultatai leidžia manyti, kad mechaniniai aplinkos signalai perduodami į branduolį veikia ląsteles biochemiškai ar biofizikiniu būdu (Walker *et al.*, 2018).

#### **1.4.2 Pagrindiniai ECM komponentai**

ECM yra sudarytas iš įvairių baltymų, kurie formuoja skirtingas struktūras ir pasižymi skirtingomis savybėmis. Pagrindiniai ECM komponentai yra kolagenas, proteoglikanai, lamininas ir fibronektinas (Walker *et al.*, 2018; Henke *et al.*, 2019). Taip pat egzistuoja šių komponentų subtipai, kurie specifiškai lemia tam tikras ECM funkcijas, bendrą struktūrą ir savybes.

Kolagenas yra svarbiausias ECM komponentas ir labiausiai žmogaus audiniuose paplitęs baltymas. Iki šiol atrasti 28 unikalūs kolageno subtipai. Kiekvienas iš jų yra sudarytas iš homotrimerų arba heterotrimerų, formuojančių kairės rankos sukimo spiralines  $\alpha$  grandines, kurios tarpusavyje sudaro trigubas dešinės rankos sukimo spiralines struktūras. Kolageno superšeima yra didelė baltymų grupė, kuriai būdingas Gly-X-Y motyvas. X ir Y įprastai būna prolinas arba hidroksiprolinas. Nors kolageno struktūroje yra daug prolino, dešinės rankos

sukimo spiralinę struktūrą stabilizuoja glicino molekulės, susijungusios vandenilniais ryšiais ir elektrosstatinės sąveikos, kuriose dalyvauja lizino ir aspartato molekulės (žr. 1.4 pav.).



**1.4 pav. Apibendrinta kolageno molekulės struktūra.** a) triguba kolageno spiralė, b) viena iš spiralę sudarančių grandinių, c) aminorūgščių išsidėstymas grandinėje (Knupp & Squire, 2003).

Fibriliniai kolagenai formuoja siūlines struktūras, kurios aptinkamos sausgyslėse, kremzliniame audinyje, odoje ir ragenoje. Dažniausias fibrilinio kolageno tipas yra kolagenas I, kuris aptinkamas jungiamuosiuose audiniuose nuo odos iki kaulinio audinio. Kolagenas I dalyvauja tokiuose procesuose kaip žaizdų gijimas ir organų vystymasis.

Visi fibriliniai baltymai iš pradžių sintetunami kaip pirmtakai, vėliau  $\alpha$  grandinės sujungiamos kartu šiurkščiajame endoplazminiame tinkle – pradedamos formuoti trigubos spiralinės struktūros. Prolinai ir lizinais yra hidroksilinami, kolageno molekulė yra glikozilinama ir taip inicijuojamas trigubos spiralės susidarymas. Prokolagenas tuomet nunešamas į Goldžio aparatą, kuriame molekulė yra paruošiama ląsteliniam eksportui. Prokolageno apdorojimas vyksta arba ECM sekrecijos metu, arba po jos. C galo peptidas yra nukerpamas specifinių **matrikso metaloproteinazių (MMPs)**. Jeigu šis peptidas nėra pašalinamas, kolageno molekulė pasižymi tirpumu ir neformuoja fibrilinių struktūrų. Kolageno tipo I, II ir III N-propeptidai taip pat yra nukerpami, tuo tarpu tipo V, XI ir kitų fibrilinių kolagenų N-propeptidai yra paliekami. Tai keičia gijos formą ir skersmenį, nepaveikiant gijos susidarymo. Kolageno V ir XI N-propeptidai išsikiša tarpuose tarp kolageno molekulių ir tokiu būdu neleidžia vykti šoniniam molekulių augimui, kuris gali įvykti dėl molekulės erdvinių kliūčių ar krūvių sąveikų. Šiuo metu manoma, kad V ir XI tipo kolagenas dalyvauja kolageno gijų susidarymo reguliavime. Tyrimuose su pelėmis buvo

nustatyta, kad nesant V tipo kolageno nesurenkamos kolageno molekulės gijoms susidaryti ir bendrai pastebėta, kad tokiose pelėse daugelyje audinių yra nedidelis kolageno kiekis (Walker *et al.*, 2018). Susiformavus mikrofibrilėms, jos gali jungtis tarpusavyje ir sudaryti stambesnes gijas. Šis procesas reguliuojamas baltymų, vadinamų **mažais, daug leucino turinčiais proteoglikanais (angl. *small leucine rich proteoglycans*, SLRP)**. Tokie SLRP kaip dekorinas ir biglikanas turi motyvus jungimuisi su kolagenu ir gali reguliuoti gijos augimą, jos dydį, morfologiją ir sudėtį.

Kita kolagenų subšeima yra su fibrilėmis asocijuoti kolagenai su pertrauktomis spiralinėmis (angl. fibril-associated collagens with interrupted helices, FACIT), kurie neformuoja gijų, bet sąveikauja su kolageno mikrofibrilių paviršiumi. Jų pagrindinė funkcija - formuoti aukštesnio lygmens struktūras jungiantis su kitais ECM baltymais, tokiais kaip SLRP ir proteoglikanai. Kolageno struktūros toliau stabilizuojamos baltymų liziloksidazių (LOX), kurios lemia mechaniškai tvirtos struktūros sudarymą: N ir C terminaliniai galai kolageno molekulėse yra kovalentiškai surišami LOX fermento tiek kolageno mikrogijos viduje, tiek tarp kelių atskirų mikrogijų. Be fibrilinių ir FACIT subšeimų dar egzistuoja tinklus formuojantys kolagenai, tokie kaip IV, VIII ir X tipo kolagenai. Šie kolagenai aptinkami pamatinių membranų bazalinėje laminoje. Kolagenas IV formuoja tetramerą per jų 7S N-terminalinį domeną. Kiekvienas kolageno IV tetrameras yra su kita kolageno IV tetramero molekule jungiasi per jų C-terminalinį NC1 domeną kiekvienoje  $\alpha$  grandinėje ir susidaro heksameras. Šie du kolageno IV domenai leidžia suformuoti stabilų kolageno tinklą, kuris atskiria bazalinę laminą nuo tarpinės stromos.

Nors skirtingo tipo kolagenai gali sudaryti įvairaus tipo aukštesnio lygmens molekulinės struktūras, kurios sudaro ECM architektūros pagrindą, kiti ECM baltymai kaip proteoglikanai, lamininai ir fibronektinas taip pat yra svarbūs dalyviai. Šie baltymai daro didelę įtaką ECM cheminėms ir fizinėms savybėms, turi augimo veiksnius prisijungiančius motyvus. Jie taip pat dalyvauja kaip priemonė komunikacijai tarp ECM ir ląstelių (Walker *et al.*, 2018).

### **1.4.3 ECM ir mechaninis ląstelių atsakas**

Mechaninės ECM savybės, t.y. ECM kietumas, yra gyvybiškai svarbi fizinė savybė, lemianti ląstelės likimą ir jos funkcijas, dalyvauja reguliacijoje daugelio svarbių ląstelės procesų, tokių kaip: ląstelės proliferacija, migracija, plitimas, morfologija ir kamieninių ląstelių diferenciacija (Sunyer *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015; Mih *et al.*, 2011). Organizme ląstelių mikroaplinkos kietumas, kuris yra įvertinamas paskaliais (Pa), labai varijuoja priklausomai nuo audinio, pvz. smegenų - 260-490 Pa, kepenų - 640 Pa, inkstų – 2,5 kPa,

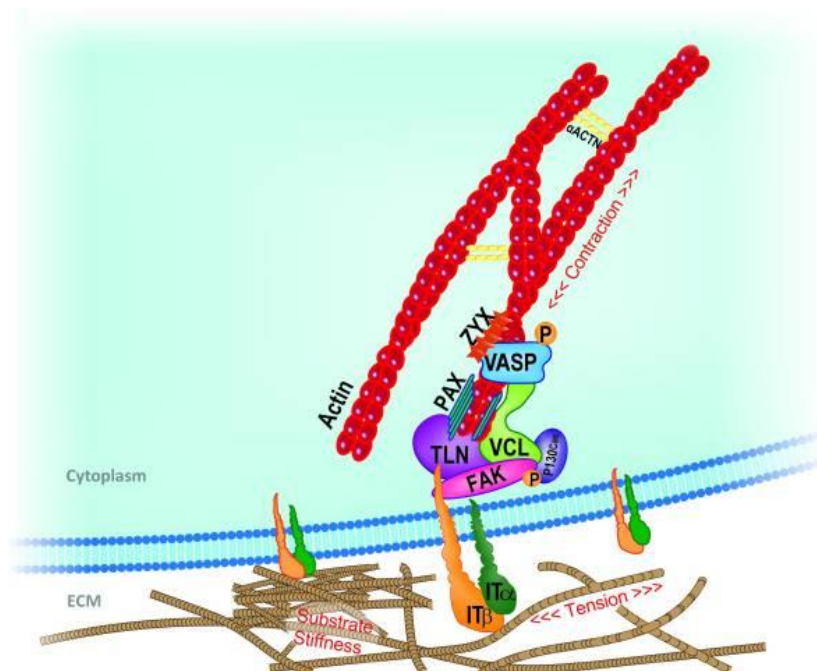


skeleto raumenų – 12-100 kPa, kremzlių – 950 kPa. Taip pat, lokalus kietumas gali stipriai skirtis – susidaro didelių skirtumų kietumo gradientai, kurie yra būdingi pereinamiesiems audiniams. Audinio kietumo variacijos gali susidaryti ir esant pataloginiams reiškiniams, pvz. formuojantis augliui. Pastebėta, kad augliai yra kietesni nei juos supantis sveikas audinys (Sunyer *et al.*, 2012). Kietumo skirtumai atlieka svarbų vaidmenį tokiaime procese kaip kryptinga fibroblastų migracija, kurie juda iš minkštų į kietus ECM regionus. Šis kryptingas judėjimas dar yra vadinamas **durotaksiu arba mechanotaksiu**. Mezenchiminės kamieninės ląstelės diferencijuojasi po durotaksio perėjimo ir jų specializacijos lygmuo priklauso ne tik nuo vidutinio aplinkos kietumo, bet ir nuo kietumo variacijos. Manoma, kad kietumo gradientas taip pat svarbus vedlys migruojant ir vėžinėms ląstelėms pereinamajame ECM link intravazacijos srities (Sunyer *et al.*, 2012). Kad ląstelės gebėtų skirtingai elgtis skirtingo kietumo ECM, jos turi pasižymėti gebėjimu aptikti ir reaguoti į mechaninius ECM skirtumus. Šis gebėjimas vadinamas „kietumo jutimu“. Parodyta, kad ląstelės reaguoja į aplinkos kietumą per dinaminį integrinų klasterizavimo reguliavimą, fokalinės adhezijos kompleksų sudarymą ir aktino filamentų remodeliavimą. Dėka citoskeleto filamentų ir adhezijos baltymų pergrupavimo kinta ląstelės morfologija ir gebėjimas migruoti, kurie charakterizuoja ląstelės transformaciją (Lin *et al.*, 2015).

#### 1.4.3.1 Fokalinės adhezijos

Kontaktuodamos su standžiais paviršiais, po plazmine membrana ląstelės paprastai formuoja baltyminius kompleksus, vadinamus **fokalinėmis adhezijomis (FA) arba sutelktiniu sąlyčiu**. FA yra ląstelės-ECM sąveikos centrai, perduodantys mechaninius signalus iš ECM į ląstelės citoskeletą. Fokalinės adhezijos yra sudėtinės struktūros, kurias galima suskirstyti į transmembraninę ir viduląstelinę dalis. Viduląstelinė dalis sudaryta iš pastolinių (angl. *scaffolding*), prijungiančių (angl. *docking*) ir signalinių baltymų, kurie tarnauja kaip sąsaja tarp transmembraninių komponentų, tiesiogiai sąveikaujančių su ECM ir aktino citoskeletu. Molekulinė FA kompozicija yra labai variabili ir jautri ECM sudėčiai, kuri juntama per integrinų sąveikas. Skirtingas integrinų klasterizacijos lygis, apsprendžiamas tarpų ir prieinamumo prie ECM adhezijos vietų, nulemia viduląstelinių FA baltymų komplektavimą (Martino *et al.*, 2018). Tyrimais nustatyta, kad ant kieto paviršiaus (> 1 GPa) kultivuojamose ląstelėse integrinai yra stipriau reiškami ir klasterizuojami, ląstelės formuoja daugiau FA ir sąveikauja didesniu paviršiaus plotu, lyginant su ląstelių kultūromis, augintomis ant minkšto paviršiaus (20 ar 0,2 kPa) (Yeh *et al.*, 2017). Dalis viduląstelinių FA

baltymų yra pasižymintys mechanojautrumu, kiti atlieka išorės-vidaus signalų perdavimą. FA aparatas pavaizduotas 1.5 pav. (Martino *et al.*, 2018)



**1.5 pav. Pagrindiniai mechanojutimo komponentai fokalinės adhezijos srityje, dalyvaujantys ląstelės-ECM sąveikoje.** Užląsteliniai kietumo pokyčiai, įtampa ar kiti mechaniniai stimulai yra atpažįstami integrinų IT sancaupų, kurių morfologiniai pokyčiai ar pasiskirstymas prijungia FAK. TLN, VCL, PAX ir adaptorinis baltymas p130Cas susijungia tarpusavyje ir perduoda mechaninius signalus iš integrinų aktinui. FA branduolyje, VASP, ZYX ir ACTN kompleksas tiesiogiai reguliuoja aktino surinkimą ir pokyčius. (ACTN - *actinin*; FAK - *focal adhesion kinase*; IT - *integrin*; PAX - *paxillin*; TLN - *talin*; VASP - *vasodilator-stimulated phosphoprotein*; VCL - *vinculin*; ZYX - *zyxin*) (Martino *et al.*, 2018).

**Integrinai** – heterodimeriniai transmembraniniai receptoriai, kuriuos sudaro alfa ir beta subvienetai [68,70, 71]. Yra žinomi 24 integrinų receptoriai žinduoliuose, kiekvienas jų atpažįsta specifinius ECM ligandus. Integrinų vykdoma adhezija prasideda konformaciniais pokyčiais integrino ektodomene. Jie pakeičia integrino molekulę iš žemo afiniškumo į aukšto afiniškumo struktūrą specifiniam ECM ligandui. Kindlinas ir talinas prisijungia prie integrino citoplazminių „uodegų“ ir skatina integrino aktyvaciją (Sun *et al.*, 2016). Nors integrinai svarbūs normaliam ląstelių mechanojutimui, anomalūs integrinų mechaniniai signalai gali dalyvauti auglio ląstelių migracijoje, invazijoje, augime ir metastazėse (Cobbout *et al.*, 2020).

**Fokalinės adhezijos kinazė (FAK)** yra nereceptorinė kinazė, kuri perduoda signalus, vykstant ląstelės FA sąveikai su ECM. Be signalinės kinazės funkcijos, FAK taip pat atlieka pastolinio baltymo vaidmenį sąveikaudama su įvairiais FA sudarančiais baltymais. Per sąveikas FA komplekse, FAK yra veikiamą jėgų ląstelės viduje ir išorėje. Ląstelių tyrimais

parodyta, kad padidintos jėgos FA aktyvina FAK. Taip pat, atrodo, kad FAK atlieka jėgos jutimo funkciją, kadangi FAK reikalingas ląstelės atsakui į išorinių jėgų poveikį ar migruoti link kietesnio substrato, kuris leidžia sukurti didesnę jėgą fokalinėse adhezijose. Vis dėlto, nėra žinoma, ar FAK yra pirmasis atsakantysis dalyvis į ląstelę veikiančias jėgas, ar FAK netiesiogiai aktyvinama jėgos per aukščiau esančius signalinės grandinės dalyvius (Bauer *et al.*, 2019).

### 1.4.3.2 Mechanoatsako dalyviai YAP/TAZ

Transkripcijos koaktyvatoriai *Yes-associated* baltymas (YAP) ir jo paralogas, WW domeną turintis transkripcijos reguliatorius 1 (TAZ) dalyvauja daugelyje ląstelės procesų (Dobrokhotov *et al.*, 2018). Skirtingo ECM kietumo įtakoje, YAP/TAZ yra svarbūs dalyviai reguliuojant ląstelių proliferaciją, diferenciaciją, išlikimą (Sun *et al.*, 2016). YAP/TAZ yra ląstelės mikroaplinkos struktūrinių ir mechaninių pokyčių jutikliai, reguliuojami tirpių užląstelinių veiksmų, ląstelės-ląstelės adhezijos ir mechanotransdukcijos, atlieka pagrindinį vaidmenį dalyvaujant mechaninių signalų perdavime branduolio transkripcijos aparatui, daugiausia sąveikaudamas su TEA domeną turinčių baltymų šeima. YAP ir TAZ gali būti lokalizuoti citoplazmoje arba branduolyje. Esant dideliame ląstelių tankiui YAP lokalizuotas citoplazmoje, tačiau ląstelėse, kurios prarado kontaktą su šalimais esančiomis ląstelėmis, YAP persikelia į branduolį. Ląstelių kontaktų sklaida su pamatiniu substratu, substrato kietumas lemia mechaninę įtampą, kuri yra svarbus veiksnys apsprendžiant viduląstelinio YAP lokalizaciją, atsakant į ląstelių tankį (Cobbout *et al.*, 2020).

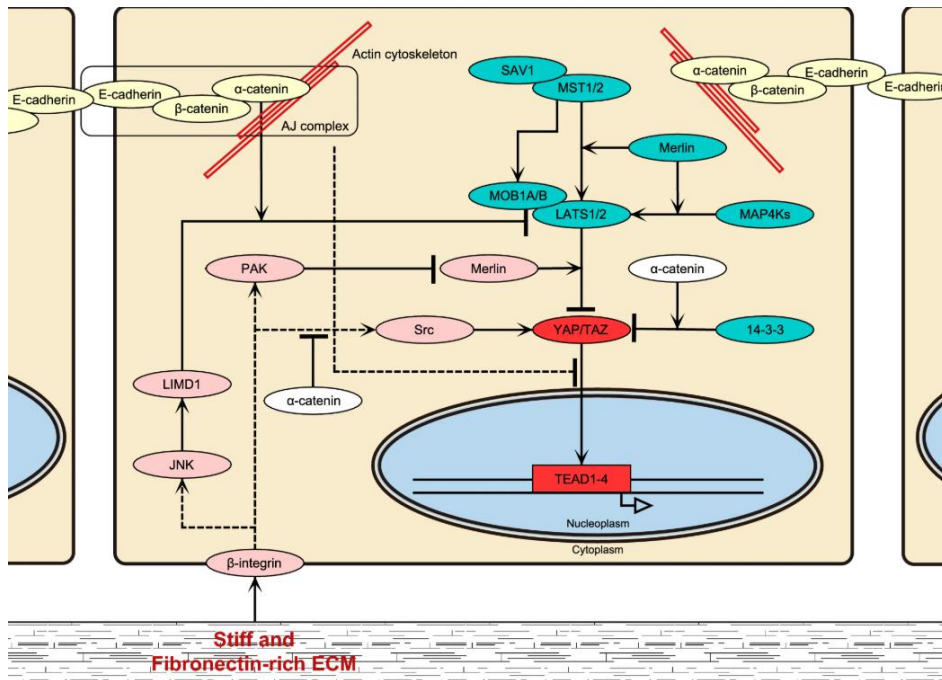
Kanoninis YAP/TAZ reguliavimo mechanizmas yra fosforilinimo kaskada, vykdoma Hippo signalinio kelio, tačiau Hippo kelias nėra vienintelis YAP/TAZ reguliatorius. YAP/TAZ yra identifikuoti kaip mechanotransdukcijos vykdytojai, kurie gali būti reguliuojami įvairių mechaninių stimulų per Hippo-nepriklausomus signalinius kelius (Cobbout *et al.*, 2020; Dobrokhotov *et al.*, 2018).

Hippo signalinis kelias slopina YAP/TAZ perkėlimą į branduolį. Šio signalinio kelio pirmasis dalyvis - MST1/2—STE20 šeimos baltymų kinazės, kurios fosforilina LATS1/2 hidrofobinius motyvus. Fosforilinimas aktyvuoja LATS1/2, kuri tuomet fosforilina YAP/TAZ serino liekanas – tokiu būdu YAP/TAZ išlaikomi citoplazmoje. MST1/2 gali fosforilinti LATS1/2 ir netiesiogiai fosforilinant SAV1 ir MOB1A/B, kurie tuomet fosforilina LATS1/2. Prieš tai buvo manyta, kad MST1/2 yra pagrindinė LATS1/2 fosforilinti kinazė, tačiau vėliau tyrimais parodyta, kad MST1/2 kiekio sumažėjimas nekeičia YAP fosforilinimo. Paraleliai MST1/2, MAP4K šeimos kinazės taip pat gali aktyvuoti LATS1/2. Fosforilintas YAP/TAZ

reaguoja su 14-3-3, kuris blokuoja YAP/TAZ persikėlimą į branduolį. Adaptorinis baltymas  $\alpha$ -kateninas stabilizuoja YAP ir 14-3-3 kompleksą, neleisdamas vykti YAP defosforilinimui. Iškelta prielaida, kad  $\alpha$ -kateninas lokalizuojasi ne tik tarpląstelinių jungčių kompleksuose (AJ) prie plazminės membranos, bet ir citoplazmoje, kurioje sąveikauja su YAP.

Ląstelės prisijungia prie ECM per FA, kurios tarpininkauja tarp ECM ląstelės išorėje ir aktino citoskeleto ląstelės viduje. Ląstelės reaguodamos į ECM kietumo pokyčius, keičia savo formą ir elgseną. Ląstelės morfologija ir kontakto su ECM plotas reguliuoja YAP perkėlimą į branduolį, paveikiant nuo LATS1/2 priklausomą YAP fosforilinimą. Integrino signalai dalyvauja YAP perkėlime į branduolį, kai kietas ir fibronektinu turtingas ECM aktyvuoja  $\beta$ 1-integrino-FAK-Src-PI3K-PDK1 signalinį kelią, kuris slopina LATS1/2 ir tokiu būdu YAP gali persikelti į branduolį ir reikšti savo transkripcinį aktyvumą. Dar vienas  $\beta$ 1-integrino reguliuojamas signalinis kelias Src-Rac1-PAK taip pat slopina LATS1/2 vykdomą YAP fosforilinimą. Pak aktyvacija sukelia Merlin baltymo fosforilinimą ir nuslopina šio baltymo aktyvumą skatinti YAP fosforilinimą per LATS1/2. Nėra aišku, ar FAK-Src-PI3K-PDK1 ir Src-Rac1-PAK signalai susidaro vienoje kaskadoje, ar veikia lygiagrečiai. Dar vienas iš galimų YAP/TAZ aktyvacijos mechanizmų yra JNK vykdomas Ajuba šeimos baltymo LIMD1 fosforilinimas, kuris lemia LIMD1 ir LATS1/2 komplekso susidarymą. Esant didelei AJ asocijuoto aktomiozino įtampai,  $\alpha$ -kateninas tampa atviros konformacijos ir pritaikia LIMD1- LATS1/2 kompleksą. Tokiu būdu LATS1/2 kinazinis aktyvumas yra nuslopinamas ir YAP gali persikelti į branduolį. Spėjama, kad  $\alpha$ -kateninas gali veikti kaip YAP aktyvatorius ir slopiklis, priklausomai nuo to, kokio tipo aktomiozino citoskeletas dominuoja (asocijuotas su FA ar AJ) ir priklausomai nuo citoskeleto įtempimo (Dobrokhotov *et al.*, 2018).

Aplinkos kietumas yra universalus mechaninis veiksnys, kontroliuojantis ląstelės pasirinkimą daugintis arba mirti. Priklausomai nuo ECM kietumo, ląstelės keičia savo sklaidos ir migracijos potencialą. YAP/TAZ yra aktyvuojami kieto ECM ir išsitempusios ląstelės formos per integrinų signalinius kelius, tuo tarpu minkšta ECM aplinka ir apvali ląstelės forma YAP/TAZ slopina. Ant kieto ECM kultivuojamose ląstelėse aptinkamas aktyvuotas YAP/TAZ, kurio didžioji dalis lokalizuojasi branduolyje ir didina transkripcinį aktyvumą, tuo tarpu minkšto ECM aplinkoje YAP/TAZ yra nuslopintas ir relokaluotas citoplazmoje. Taigi, kietame ECM augančios ląstelės skatina proliferaciją ir vysto invazyvius fenotipus padidindamos adhezijos receptorių raišką ir aktyvumą, taip pat ir mechanotransdukcijos signalinius kelius (Cobbout *et al.*, 2020).



**1.6 pav. YAP/TAZ reguluojantys signaliniai keliai.** Mėlyna spalva pažymėti Hippo signalinio kelio dalyviai, rožine spalva – susiję su FA, geltona – baltymai, priklausantys tarpplastelinėms jungtims.

#### 1.4.3.3 MAPK ir jų vaidmuo ECM kitimo kontekste, sąsajos su YAP/TAZ

**Mitogenų aktyvuojamos baltymų kinazės (MAPK)** – viena iš didžiausių transferazių grupių, kuriai priklausantys fermentai katalizuoja baltymų substratų serino ir treonino liekanas (Jagodzik *et al.*, 2018). MAPK signalinės kaskados atlieka labai svarbų vaidmenį perduodant užląstelinius signalus į ląstelės vidų ir dalyvauja daugelyje ląstelinių procesų: proliferacija, diferenciacija, apoptozė, angiogenezė, metastazės. Eukariotinėse ląstelėse yra identifikuotos 4 signalinės kaskados: ERK, JNK/streso aktyvuojamos kinazės, p38 ir ERK5. JNK ir p38 kaskados susijusios su stresu ir apoptoze, tuo tarpu ERK/MAPK yra susiję su proliferacija ir diferenciacija (Guo *et al.*, 2020).

Tyrimais parodyta, kad padidinta mechaninė įtampa gali lemti MAPK signalinių kaskadų aktyvaciją, tarp jų ERK, p38 ir JNK. *In vitro* HCC ląstelių tyrimais parodyta, kad didėjant hidrogelio kietumui, didėja p-ERK1/2, p-JNK ir p-p38 raiška. Siekiant išsiaiškinti, ar minėtosios MAPK daro įtaką YAP raiškai, buvo panaudoti šių kinazių inhibitoriai. Gauta, kad p38 ir JNK inhibitoriai slopino ir YAP aktyvaciją, bei šio baltymo kiekį branduolyje, tuo tarpu MEK1/2 inhibitoriai neturėjo įtakos. Toliau buvo patikrinta p38 ir JNK inhibitorių įtaka YAP taikinių genų raiškai ir buvo gauta, kad šie inhibitoriai žymiai sumažino didesnio aplinkos kietumo indukuojamą CYR61 ir CTGF raišką, taip pat minėtųjų MAPK inhibitoriai mažino ir HCC ląstelių migracijos potencialą kietoje aplinkoje, kuris sumažėjo iki panašaus

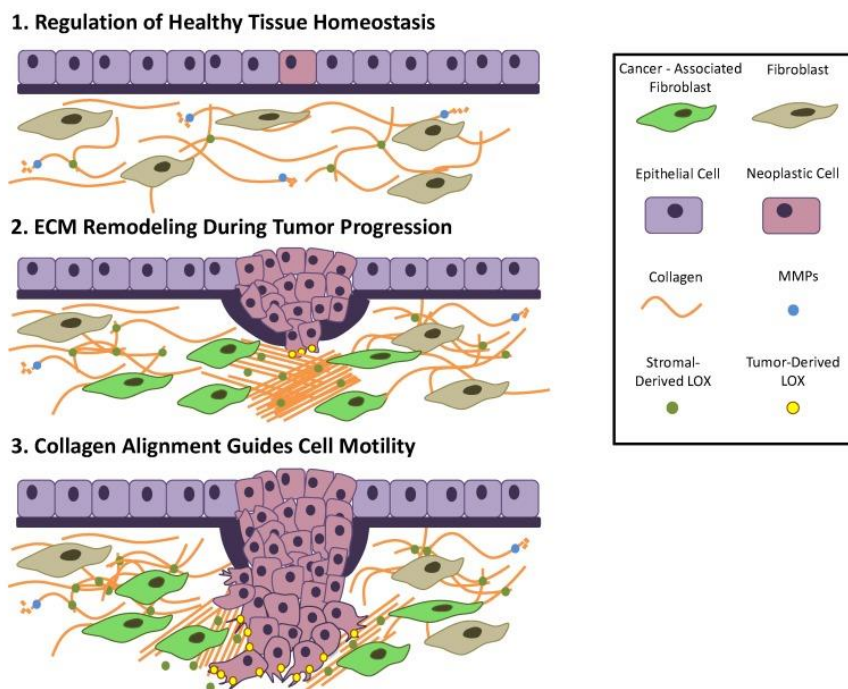
lygio su ląstelėmis, augintomis minkšto gelio aplinkoje. Prieita prie išvados, jog aplinkos kietumo lemiamą YAP aktyvacija yra priklausoma nuo JNK ir p38 signalinių kaskadų ir ECM kietumas lemia HCC ląstelių migraciją per MAPK-YAP mechanotransdukciją (Liu *et al.*, 2020). Panašūs rezultatai gauti ir mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse, kuriose ERK ar JNK inhibitoriai daro įtaką TAZ aktyvumui ir osteogeninei diferenciacijai atsakant į ECM kietumą (Hwang *et al.*, 2015). ERK1/2 ir JNK yra susietos ir su ECM degradacija vėžinėse ląstelėse. Šios MAPK tarpininkauja Caveolin-1 vykdomoje MMP-9 raiškos reguliacijoje Ewing sarkomos ląstelėse (Lagares-Tena *et al.*, 2016). Taip pat, nuo MAPK/ERK signalinio kelio aktyvacijos priklausoma ir MMP-2 bei MMP-7 raiška (Guo *et al.*, 2020).

C-Jun – tai transkripcijos veiksnys, koduojamas geno *JUN* ir priklausantis AP-1 baltymų grupei. AP-1 baltymai formuoja dimerinius kompleksus, į kurių sudėtį gali įeiti šiai grupei priklausančių JUN, FOS, ATF ar MAF šeimų baltymai. (Gazon *et al.*, 2018). c-Jun aktyvumo reguliacijai daugiausia įtakos turi mitogenų aktyvuojamų baltymų kinazių (MAPKs) signaliniai keliai. Tarp jų c-Jun N-terminalinės kinazės (JNK) ir ERK signaliniai keliai yra du dominuojantys mechanizmai, kurie fosforilina ir stabilizuoja c-Jun. Aktyvuotas c-Jun persikelia iš citoplazmos į branduolį. C-Jun aktyvacija reguliuoja genus, dalyvaujančius daugelyje su piktybėjimu susijusių procesų, tarp jų: proliferacija, apoptozė, invazija ir tumorigenezė. (Qin *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2010; Vleugel *et al.*, 2006). Chromatino imunoprecipitacijos analizė atskleidė, kad YAP/TEAD kompleksai jungiasi prie regionų artimų AP-1 prisijungimo vietoms promotoriuose genų, kurie svarbūs ląstelės ciklo progresijai. Šie duomenys leidžia manyti, kad YAP jungiasi su TEAD transkripcijos veiksniais ir kooperuojasi su c-Jun/c-Fos kompleksu bent dalinai, ir lemia ląstelinę transformaciją sukeliančius aktyvumus (Nishimoto *et al.*, 2019).

Augimo veiksnių (GF) signalai per receptorines tirozino kinazes (RTK) aktyvuoja mažąsias GTPazes RAS, kurios gali perduoti signalus Pi3K-AKT ar klasikiniam RAF-ERK signaliniams keliams, kurie aktyvuoja TCF ir AP-1 transkripcijos veiksnius. Onkogenų kooperacija su YAP-TEAD ir AP-1 taikantis į tikslinių genų promotorius yra gerai išvystyta varomoji jėga auglio ląstelių proliferacijai įvairiose vėžio formose. RAS signalinis kelias yra dažnai aktyvuojamas mutacijų žmogaus vėžiniuose susirgimuose ir gali funkcionuoti pakeičiant normalų gyjimo/regeneracijos atsaką į nenutrūkstamą ląstelių dalijimąsi ir auglio formavimąsi kooperuojantis su YAP/TAZ (Thompson, 2020).

#### 1.4.4 ECM kietėjimas ir vėžio vystymasis

Tradicinis požiūris į vėžį pasikeitė ir pradedamas atkreipti dėmesys į ECM vaidmenį ląstelių proliferacijoje, migracijoje ir apoptozėje. Mikroskopiniame lygmenyje, tam tikras ECM komponentų išsidėstymas ir kryptis sukuria audiniui specifinę mikroaplinką, kuri atlieka reikšmingą vaidmenį ir auglio progresijoje. Dabar yra žinoma, kad ECM vyksta ne tik nuolatinis remodeliavimas, bet taip pat ir biocheminiai, biofizikiniai pokyčiai darantys įtaką ląstelių adhezijai ir migracijai. Maži pokyčiai mikroaplinkos homeostazėje gali turėti reikšmingą efektą vėžinių ląstelių proliferacijai. ECM svarbiausias komponentas kolagenas palaiko pagrindines matrikso funkcines savybes, todėl kolageno gijų susidarymo ar degradacijos pokyčiai gali lemti ECM homeostazės praradimą. Proliferuojant auglio ląstelėms, aplinkinis ECM patiria didelius struktūrinius pertvarkymus, kurie įvyksta kaip padarinys dinamiųjų sąveikų tarp mikroaplinkos ir joje esančių ląstelių (žr. pav. 1.7).



**1.7 pav. Audinio piktybėjimas ir ECM pertvarka.** 1-3 paveiksluose parodyta kaip kinta ECM sandara formuojantis augliui. Ilustracijos komponentai nurodyti iliustracijos dešinėje.

Tarp šiame kontekste vykstančių ECM pokyčių - padidinta fibronektino, kolagenų I, III ir IV sekrecija. Tai parodo, kad auglio progresijai reikalingas nuolatinis kontaktas tarp mikroaplinkos ir vėžinių ląstelių. Padidintas baltymų gijų susidarymas matrikse skatina auglio progresiją trikdydamas ląstelės-ląstelės adheziją, ląstelės poliariškumą ir tokiu būdu skatinami augimo veiksmų signalai. Vis dėlto, kolageno vaidmuo piktybėjimui yra nevienareikšmiškas.



Neseniai atliktos studijos parodė, kad sutankėjęs kolageno tinklas skatina auglio progresą dėl padidinto integrinų signalo, tačiau fibrilinio kolageno I ir III trūkumas taip pat skatina piktybinių ląstelių elgesį. Galima manyti, kad biomechaninės jėgos sukuriamos kolageno gijų teikia tiek teigiamus, tiek neigiamus efektus auglio progresijos eigoje.

Kolageno tinklo susidarymas gali vykti tiek dėka fermentų, tiek be jų veikimo. Fermentų reguliuojamas kolageno tinklo susidarymas pirmiausia kontroliuojamas LOX ir LOX amino oksidazių šeimos atstovų. LOX, kuris yra sekretuojamas auglio ląstelių, yra atsakingas už kolageno ir elastino gijų sujungimo katalizavimą. Tai padidina tiek ECM kietumą, tiek ir šalimais esančio ECM tūrį. Padidėjęs ECM kietumas aktyvuoja integrinus ir didina Rho generuojamą citoskeleto įtampą, skatinant fokalinės adhezijos susidarymą ir ląstelės judrumą. Padidintas LOX aktyvumas buvo kliniškai susietas su kolageno tinklo susidarymu, fibroze ir padidėjusia vėžio metastazės rizika. Taip pat, padidintas LOX aktyvumas randamas ir invaziškuose auglių pakraščiuose ir siejamas su aktino polimerizacija, ląstelės gebėjimu susitraukti ir migruoti. Pastebėta, kad invazyvios ląstelės auglyje orientuotos išilgai kolageno gijoms ir tai leidžia manyti, kad kolageno išsilygiavimas prisideda prie auglio invazyvumo susidarymo. Manoma, kad tankiai išilgai išsidėsčiusios kolageno gijos tarnauja kaip kelias proliferuojančioms neoplastinėms ląstelėms – migracijai iš auglio (Walker *et al.*, 2018).

Vėžiniams augliams yra būdingas reiškinys **dezmozoplazija** – tai yra intensyvi fibrozė, lemianti tankaus ECM susiformavimą ir jo komponentų, tokių kaip kolagenas, fibronektinas, proteoglikanai ar tenascinas C, kaupimąsi auglio viduje. Vėžinio audinio stromą didžiąja dalimi sudaro su vėžiu asocijuoti fibroblastai (CAFs), kuriems būdingas žymuo - aukštas  $\alpha$ -SMA raiškos lygis. Tokie fibroblastai būdingi ir normaliam gijančiam audiniui, tačiau pasibaigus gyjimo procesui, tokių fibroblastų kiekis sumažėja, tuo tarpu vėžiniame audinyje jie egzistuoja ir yra aktyvūs nuolat. Teigiama, kad vėžinių ląstelių TGF- $\beta$  aktyvuoja normalius fibroblastus tapti CAFs, kurie produkuoja daugiau ECM gijų ir lemia dezmozoplazijos reiškinį vėžiniame audinyje (Pickup *et al.*, 2014; Gkretsi & Stylianopoulos, 2018). ECM kietumo padidėjimas taip pat gali aktyvuoti kietumui jautrų transkripcijos veiksnių YAP, kurio aktyvuota forma iš citoplazmos persikelia į branduolį. YAP aktyvacija lemia piktybinius vėžio fenotipus: metastazes, atsparumą kontakto inhibicijai, proliferaciją ir epitelinę-mezenchiminę tranziciją. Vienas iš klasikinių YAP taikinių – baltymas CCN1, kurio raiška padidinama uždegimo, žaizdų gyjimo ir tumorigenezės procesuose (Nukuda *et al.*, 2015; Reid & Zanivan, 2017). Dezmozoplastiniai augliai yra laikomi agresyvesniais, ir tam tikrų vėžio formų atvejais siejama su mažesniais pacientų šansais išgyventi. ECM fibrozė yra būdinga



tiek vėžiniam audiniui, tiek piktybėti linkusiam audiniui. Pvz., kepenų cirozės ir cistinės fibrozės pacientų audiniams yra būdingas nenormalus kolageno kaupimasis, kuris siejamas su padidėjusia vėžio rizika. Taip pat ir padidėjęs tankis mamogramose yra siejamas su kolageno sankaupomis bei padidinta krūties vėžio rizika (Pickup *et al.*, 2014; Gkretsi & Stylianopoulos, 2018).

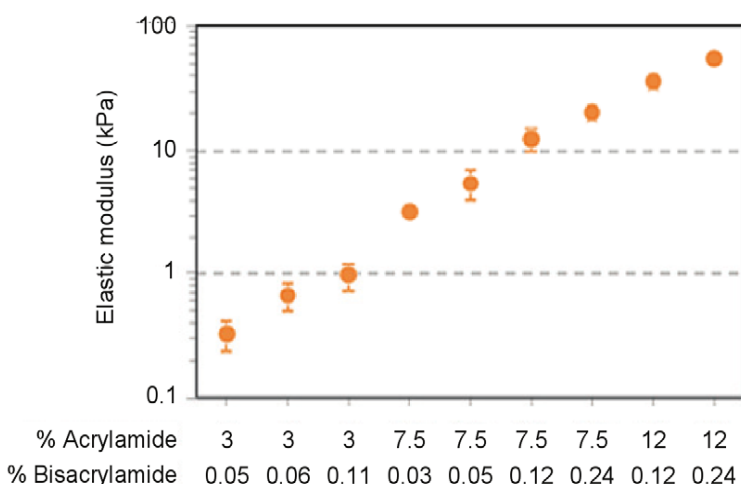
Vykstant neoplastinei progresijai, ECM kietėjimas ir tankėjimas padidina auglio kietumą. Pavyzdžiui, krūties vėžio atveju, sveiko pieno liaukos audinio kietumas yra ~200 Pa, tuo tarpu vidutinis auglio kietumas yra ~4000 Pa. Taip pat, auglį supanti stroma ir kraujagyslių tinklas prisideda prie auglio kietumo padidinimo (~800-1000 Pa ir ~450 Pa atitinkamai), tuo tarpu sveiko audinio ir kraujagyslių tinklo kietumas yra ~200 kPa. Be to, buvo parodyta, kad auglio epitelis yra kur kas kietesnis, lyginant izoliuotas auglio epitelines ląsteles ir tai duoda manyti, jog stromos mikroaplinka vaidina svarbų vaidmenį susidarant mechaniškai kietam auglio fenotipui. Nustatyta, kad matrikso kietumą lemia integrinų klasterizacija, padidėjęs fokalinių adhezijų atsakas, padidėjęs invazyvumas, pakitęs ląstelės augimas ir morfologija bei padidėjęs ląstelės gebėjimas susitraukti. Tyrimais parodyta, kad keli iš šių efektų yra sukelti padidėjusio FAK/Src signalinio kelio aktyvinimo (Kraning-Rush *et al.*, 2012).

Auglio progresija nuo pirminio auglio iki metastaziškumu pasižyminčios ligos yra sudėtingas, daugiapakopis procesas, kurio metu vėžinės ląstelės sąveikauja su jas supančia neląsteline ECM aplinka. Daugelio ECM baltymų raiška ir elgesys reikšmingai pakinta auglio progresijos metu tiek biochemine, tiek biomechanine prasme ir tokiu būdu pakinta auglio mikroaplinkos kietumas. Vienas iš pagrindinių ECM kietumo kitimo veiksnių yra padidėjęs tipo I kolageno kaupimasis. Fibrilinis kolagenas I sudaro fizinį karkasą, kuris suteikia audiniui tvirtumo ir kietumo. Kolageno fibrilių tankumas ir išsidėstymas varijuoja skirtinguose audiniuose ir suteikia skirtingas mechanines ir biologines savybes organui. Kolageno kiekio, post- transliacinių modifikacijų ir sąveikų pokyčiai, pastebimi tokių sutrikimų kaip fibrozė ar vėžys atvejais, gali lemti ligos atsiradimą ir progresiją. Jau kurį laiką mokslininkams yra žinoma, kad metastatinė kaskada yra fizinių pokyčių reikalaujantis procesas – vėžinės ląstelės turi tiek atsilaikyti, tiek pritaikyti jėgas aplinkai, kurios padėtų šioms ląstelėms prasiskverbti pro tankų ECM. Taip pat, gebėjimas prisitaikyti prie fizinių sąlygų yra labai svarbus metastazinei kolonizacijai, kadangi antrinės auglio susidarymo sritys yra labai skirtingos, nei ta, kurioje susidarė pirminis auglys (Wullkopf *et al.*, 2018).

## 1.5 Poliakrilamidiniai geliai ir jų pritaikomumas aplinkos kietumo tyrimams

Nors daugelis ląstelės biologijos tyrimų atliekama ant stiklo ar plastiko paviršių, tokios sąlygos mažai atkartoja fiziologines sąlygas, kokiose ląstelės yra aptinkamos natūraliai. Daugelis žinduolių ląstelių tipų egzistuoja 3D aplinkoje, kurioje jos yra veikiamos daugelio cheminių, fizikinių ir struktūrinių veiksnių, kintančių laike dėl atsako į aplinkos stimulą arba yra lemiami pataloginių reiškinių progresijos (Kraning-Rush *et al.*, 2012).

Aplinkos kietumas tapo ląstelės ir biologinių medžiagų tyrimo objektu, kadangi šis parametras gali būti kontroliuojamas *in vitro* sąlygomis. Paprastai šiam tikslui pasiekti naudojami poliakrilamido (PA) geliai, kurie pasirinkti taikyti dėl plataus spektro linijiskumu pasižyminčio elastiškumo, leidžiančio pamėgdžioti įvairių audinių kietumus (Mih *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2016). Akrilamido-bisakrilamido kiekio santykis lemia gelių kietumą, kuris įvertinamas atominės jėgos mikroskopijos mikroįdubimo (angl. *AFM microindentation*) metodu (pav. 1.8) (Mih *et al.*, 2011).



### 1.8 pav. Gelių kietumo priklausomybė nuo akrilamido:bisakrilamido santykio

Akrilamido:bisakrilamido kiekis geliuose buvo ekstrapoliuotas iš ankstesnės studijos (Yeung *et al.*, 2005), siekiant praplėsti gelio kietumo intervalą nuo 0.3 iki 55 kPa, kad būtų aprėptos įvairius kūno audinius atitinkančios kietumo vertės. Atominės jėgos mikroskopijos mikroįdubimų metodu įvertintas Young modulis (vienas iš elastinio modulio tipų). Y ašyje nurodytos elastinio modulio vertės kilopaskaliais (kPa), X ašyje – akrilamido ir bisakrilamido kiekis procentais gelio mišinio sudėtyje.

Pastebėta, kad įvairių ląstelių linijos yra linkusios daugintis greičiau didinant substrato, ant kurio auginamos ląstelės, kietumą. Vis dėlto, išskirtiniais atvejais ląstelių linijos pasižymi nejautrumu aplinkos kietumo pokyčiams – galima daryti prielaidą, kad gebėjimas reaguoti į mechaninius signalus gali būti prarastas piktybinės transformacijos metu. Mih *et al.* nustatė, kad didinant ligando kiekį ant PA gelio iki 12 kartų nuo minimalaus aptinkamo ligando

kiekio, ląstelių susikaupimas aiškiai padidėja ant minkštų substratų, kurių kietumas 1 ir 6 kPa. Tuo tarpu, nepaisant ligando kiekio ant substrato, ląstelių susikaupimas išlieka didelis ant kietesnių substratų, kurių kietumas 20 ir 55 kPa. Ląstelių proliferacijos padidėjimas priklausomas nuo substrato kietumo buvo patvirtintas pritaikant BrdU inkorporaciją, tuo tarpu ląstelių augimo supresija ant mažos vertės kietumo gelių susieta su padidėjusiu kaspazių 3/7 aktyvumu (apoptozės indikatorius) (Mih *et al.*, 2011).

Taip pat, PA geliai neskatina baltymų absorbcijos ar ląstelių adhezijos – tai suteikia geras sąlygas kontroliuoti ląstelių adhezijos ligandų funkcinių grupių prijungimą prie gelio paviršiaus (Lee *et al.*, 2016). PA gelių sukabinimui su ECM baltymais, kurie yra reikalingi ląstelių adhezijai, yra panaudojami kabantieji N-hidroksisucinimido (NHS) esteriai. NHS esteriai acilina lizino liekanas. Viena iš labiausiai paplitusių strategijų prikabinti adhezijos ligandus – panaudoti heterobifunkcinę chemiškai sujungiančią medžiagą sulfo-SANPAH, kuris įsiterpia į PA karkasą ir fotolizuoja aril- bei azido grupes. Rezultate gaunamas prie polimero prijungtas NHS esteris, kuris dalyvauja baltymų aminorūgščių acilinimo reakcijoje. Nors šis junginys plačiai taikomas, išlieka reikšmingas skirtumas tarp junginio serijų, taip pat imobilizuoti NHS esteriai dalyvauja konkurencinėje hidrolizėje baltymų prijungimo sąlygomis. Taip pat, šie esteriai gali reaguoti su bet kuriais aminais baltymuose ir tai lemia nespecifinį prisirišimą daugelyje vietų, todėl adhezinio ligando prezentacija yra nekontroliuojama ir nenuspėjama. Imobilizuoto ligando orientacija lemia epitopų pasiekiamumą, o tai savo ruožtu lemia ir ląstelių elgesį. Be to, baltymo struktūra ir aktyvumas gali būti paveikti, jei funkciškai ir struktūriškai svarbios lizino liekanos yra susijungusios su paviršiumi (Lee *et al.*, 2016).

### **1.6 Doksorubicino poveikis**

Doksorubicinas (Dox) – plataus spektro priešvėžinis antibiotikas, kuris izoliuotas iš *Streptomyces* rūšies ir plačiai vartojamas kaip priešvėžinis preparatas nuo 1974. Dox yra antraciklinų grupei priskiriamas junginys, kuris yra sudarytas iš 4 žiedų sistemos, į kurią įeina chromoforas antrachinonas ir aminoglikozidas (Wakharde, *et al.*, 2018; Cutts *et al.*, 2005). Šis junginys pasižymi blogu įsisavinimu per burną, mažu praecinamumu ir aukštu toksiškumu sveikam audiniui. Doksorubicinas yra injekcinis vaistas, parduodamas komerciniais pavadinimais *Adriamycin*, *Rubex* ir kt. (Wakharde, *et al.*, 2018).

Dox veikia vėžines ląsteles per interkaliaciją į ląstelių DNR, dėl kurios sudaromi DNR grandinės trūkiai, slopinama DNR sintezė. Taip pat Dox yra topoizomerezės II inhibitorius.

Be to, Dox sudaro reaktyvias deguonies formas (ROS) – jis yra oksiduojamas į nestabilią metabolitą semichinoną, kuris yra verčiamas atgal į savo pradinę formą. Šio proceso metu susidaro reaktyvios deguonies formos, kurios gali sukelti lipidų peroksidaciją, membranos, DNR pažeidimus ir oksidacinį stresą, kuris įjungia apoptozės signalinius kelius. Fermentai, galintys moduluoti pastarąjį Dox aktyvumą yra dalyvaujantys oksidacijos reakcijose, pvz. NADH hidrogenazės, azoto oksido sintazės, ksantino oksidazės, ir tie, kurie geba deaktyvuoti radikalus, kaip glutationo peroksidazė, katalazė ir superoksido dismutazė (Thom *et al.*, 2011). Didesniam terapiniam efektui sukelti, Dox dažnai kombinuojamas su kitais chemoterapiniais junginiais (Wakharde, *et al.*, 2018).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1 Naudotos medžiagos

#### 2.1.1 Reagentai

| <b>Medžiagos pavadinimas</b>  | <b>Gamintojas, katalogo nr.</b>                 |
|---|---|
| Tris base   | <i>Sigma Aldrich, T1503-500G</i>                |
| Glicinas  | <i>Thermo Fisher Scientific, 15527-013</i>      |
| Natrio dodecil sulfatas (SDS)   | <i>Sigma Aldrich, 151-21-3</i>                  |
| Metanolis (MetOH)   | <i>Merck KGaA, 67-56-1</i>                      |
| Tris hidrochloridas (Tris HCl)  | <i>Carl Roth GmbH, 9090.3</i>                   |
| Tween 20  | <i>Carl Roth, 9127.1</i>                        |
| Natrio chloridas (NaCl)   | <i>Merck KGaA, 7647-14-5</i>                    |
| Lieso pieno milteliai   | <i>Merck KGaA, 70166-500G</i>                   |
| Akrilamidas   | <i>Carl Roth, 0189.2</i>                        |
| Bisakrilamidas  | <i>Aplichem, A3636,0250</i>                     |
| Amonio peroksodisulfatas (APS)  | <i>Sigma Aldrich, 7727-54-0</i>                 |
| Natrio šarmo granulės   | <i>Merck, 1310-73-2</i>                         |
| Tiazolilo mėlynojo tetrazolio bromidas (MTT)                                | <i>Merck, 475989-10GM</i>                       |
| TEMED   | <i>Carl Roth, 110-18-9</i>                      |
| Pierce ECL, HRP substratas  | <i>Thermo Fisher Scientific, 32209</i>          |
| Ožkos antriniai antikūnai prieš pelės IgG (H+L), HRP konjugatas             | <i>Invitrogen, 31430</i>                        |
| Ožkos antriniai antikūnai prieš triušio IgG (H+L), HRP konjugatas           | <i>Life technologies, 65-6120</i>               |
| Tripsinas (250x)  | <i>Thermo Fisher Scientific Inc., 27250-018</i> |
| Penicilinas-Streptomocinas  | <i>Gibco, 15-140-122</i>                        |
| Fetalinis veršelio serumas (FBS)  | <i>Gibco, 10270106</i>                          |
| Iskovo modifikuota Dulbecco terpė (IMDM)                                    | <i>Gibco, 12200069</i>                          |
| Dulbecco modifikuota Eagle terpė (DMEM)                                     | <i>Gibco, 12800-17</i>                          |
| Sulfosukcinimidil 6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)heksanoatas (Sulfo-SAMPAH) | <i>Thermo Fisher Scientific, 22589</i>          |
| 2-merkaptioetanolis   | <i>Acros Organics, 125472500</i>                |
| (3-Aminopropil)triethoksisilanas (APTES)                                    | <i>Thermo Fisher Scientific Inc., 80370</i>     |

|   |   |
|---|---|
| Natrio chloridas (NaCl)                 | <i>Merck, 106404</i>                        |
| Etilendiamintetraacetinė rūgštis (EDTA) | <i>Sigma Aldrich, 60-00-4</i>               |
| Fenilmetilsulfonil fluoridas (PMSF)     | <i>Merck, 10837091001</i>                   |
| Doksorubicinas (Dox)                    | <i>Sigma Aldrich, D1515-10MG</i>            |
| Geneticinas (G418)                      | <i>Gibco, 10131035</i>                      |
| Polibrenas                              | <i>Sigma Aldrich, TR-1003-G</i>             |
| Triton X-100                            | <i>Aplichem</i>                             |
| Aprotininas                             | <i>Sigma Aldrich</i>                        |
| <i>Page-Blue</i> dažas                  | <i>Thermo Fisher Scientific Inc., 24620</i> |
| 2-propanolis (izopropanolis)            | <i>Merck, 109634</i>                        |
| Dichlorodimetilsiloksanas (CMS)         | <i>Sigma Aldrich</i>                        |

### 2.1.2 Tirpalai

#### EDTA-tripsinas

Tripsino ir EDTA tirpalai sumaišomi atitinkamai 1:4 santykiu.

#### DMEM ir IMDM mitybinės terpės

Abi mitybinės terpės ruošiamos tokiomis pačiomis dalimis: 89% IMDM arba DMEM terpės, 10% FBS ir 1% penicilino-streptomicino. Terpės gali būti paruoštos ir be antibiotiko, tuomet pilama 90% DMEM arba IMDM ir 10% FBS.

#### Lizės buferis

10mM TrisHCl, pH 7,4, 50mM NaCl, 5mM NaF, 0,1% BSA, 1% Triton X-100. Prieš naudojimą papildomai pridedama fosfatazių ir proteazių inhibitorių; 20 µg/ml aprotinino, 1mM PMSF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Tirpalo pH privedamas iki 7.2 .

#### Pavyzdžio buferis (4x, 10 mL)

Pilama 4 ml 100% glicerolio, 2,4 ml 1M TrisHCl pH 6,8, 0,8 g SDS, 4mg bromfenolio melynjo, 3,1 ml vandens. Prieš naudojimą pridedama 0,5 ml 2 – merkaptoetanolio. Laikoma –20 °C temperaturoje.

#### Skiriantysis gelis (2 geliams, 1 mm storio)

4 mL akrilamido (4x), 2.7 mL Tris pH 8.8, 3.2 mL distiliuoto H<sub>2</sub>O. Pačiam gale įpilama 77 µL amonio persulfato ir 11 µL TEMED.

### **Koncentruojantis gelis (2 geliams, 1mm storio)**

0.8 mL akrilamido (4x), 1.3 mL Tris pH 6.8, 2.9 mL distiliuoto H<sub>2</sub>O, 48 µL amonio persulfato ir 14 µL TEMED.

### **Elektroforezės buferis (1L tirpalo)**

25mM Tris Base (3.02 g), 0.2 M glicino (14.4 g), 0.1% SDS (1g). Pasvertos medžiagos užpilamos 1 L distiliuoto H<sub>2</sub>O.

### **Pernašos buferis**

10mM TrisBase, pH 8,3, 90mM glicino, 0,05% SDS, 10% metanolio. Likęs tūris užpildomas distiliuotu vandeniu.

### **Plovimo tirpalas**

150mM NaCl; 10mM TrisHCl, pH 7,5, 0,05% Tween 20.

### **Blokavimo tirpalas**

Paruoštame plovimo tirpale ištirpinama 5% lieso pieno miltelių arba 1% jaučio albumino.

### **Geliai ląstelių eksperimentams**

**1 kPa gelis (5% Akr + 0,03% Bis):** 40% akrilamidas - 125 µl, 2% bisakrilamidas - 15 µl, TEMED - 1 µl, 10% amonio persulfatas (APS) - 10 µl, PBS - 849 µl.

**8 kPa gelis (5% Akr + 0,23% Bis):** 40% akrilamidas - 125 µl, 2% bisakrilamidas – 113,6 µl, TEMED - 1 µl, 10% APS - 10 µl, PBS - 750 µl.

**40 kPa gelis (8% Akr + 0,5% Bis):** 40% akrilamidas - 200 µl, 2% bisakrilamidas – 240,4 µl, TEMED - 1 µl, 10% amonio persulfatas (APS) - 10 µl, PBS – 548,6 µl.

## **2.2 Metodai**

### **2.2.1 Ląstelių infekcija**

Metodo eiga:

1 diena: Išsėjamos taikininės MCF-7 ir virusą produkujančios PA 317 ląstelės, kurių tankis apie 300 000 ląst./ml. Ląstelėms auginti panaudota DMEM su 10% FBS ir antibiotikais.

2 diena: Sekančios dienos rytą PA 317 ląstelių terpė pakeičiama į DMEM su 3% FBS laikoma 8-12 val. 37°C temperatūroje. Po to terpė surenkama nuo PA317 monosluoksnio, į surinktą terpę įdedama 4 µg/ml polibreno ir filtruojama per 0,45 µM filtrą. 2 ml paruoštos terpės pilama į flakoną su taikininėmis MCF-7 ląstelėmis, inkubuojama 1 val. Per šį inkubavimo laikotarpį plokštelė su ląstelėmis pajudinama 1-2 kartus, kad ląstelės būtų drėgnos. Po to pridedama dar 2-3 ml DMEM su 10% FBS ir 4 µg/ml polibreno, paliekama inkubuotis per naktį 37°C temperatūroje.

3 diena: MCF-7 ląstelių flakonėlyje pakeičiama terpė. Naudojama DMEM su 10% FBS ir 10µg/ml geniticino. Turėtų augti tik infekuotos, geniticinui atsparios kolonijos.

### **2.2.2 Ląstelių lizavimas**

Neinfekuotos MCF-7 ir infekuotos MCF-7 AS 2, AS 2.3, AS 2.4 ląstelės 2-3 dienas auginamos 37°C DMEM terpėje, kol flakonėliuose susiformuoja pilnas monosluoksnis.

Prieš pradėdant ląstelių lizavimą pasiruošiamas reikiamas lizės buferio tūris, pridedami fosfatazių ir proteazių inhibitoriai. Lizės buferio pasigaminama tiek, kad papildomai liktų apie 2 mL, kuris bus panaudotas baltymų koncentracijos sulyginimui.

Nuo susidariusio monosluoksnio nusiurbiamą terpę, praplaunama šaltu PBS tirpalu, tuomet vėl nusiurbiamą.

Į kiekvieną flakonėlį įpilama po 600 µL paruošto šalto lizės buferio, flakonėliai laikomi lede 15 min, pavartant, kad monosluoksnis visuomet būtų sudrėkintas lizės buferio. Tuomet monosluoksnis nugramdomas nuo paviršiaus, palaikoma lede dar 15 min.

Gauta lizuotų ląstelių masė surenkama į paruoštus atšaldytus 1,5 mL mėgintuvėlius, centrifuguojama +4°C temperatūroje, 14000 aps./min. Nucentrifuguotų mėgintuvėlių dugne lieka lizuotų ląstelių nuolaužas, supernatante – baltymai. Tolesnei analizei naudojamas tik supernatantas, kuris yra atsargiai nusiurbiamas ir perkeliamas į naujus lede laikomus mėgintuvėlius.



### 2.2.3 Baltymų kiekio sulginimas Bradfordo metodu

Baltymų kiekio pamatavimui, iš baltymų supernatantų pasiruošiami 10x distiliuotu vandeniui skiesti mėginiai, t.y. 1:9 supernatanto ir distiliuoto vandens, atitinkamai. Tokiu pačiu būdu paruošiamas ir fonas, kuriam naudojamas lizės buferis. Į 48 duobučių plokštelės šulinėlius supilama po 250 µL Bradfordo reagento. Pripildoma tiek šulinėlių, kiek yra supernatantų mėginių ir 1 šulinėlis fonui. 5µL 10x skiestų mėginių ir fono sumaišoma su Bradfordo reagentu, atsargiai supipetuojama vengiant burbuliukų susidarymo. Baltymų kiekis šulinėliuose įvertinamas spektrometru ties 595 nm bangos ilgiu. Iš gautų rezultatų atimama fono vertė.

Ruošiamas galutinis visų mėginių tūris, pvz. 450 mL. Mažiausią sugerties vertę ( $A_{\min}$ ) turintis mėginys lizės buferiu neskiedžiamas, į naują lede laikomą mėgintuvėlį pilama 450 µL supernatanto. Kitų mėginių tūriai paskaičiuojami remiantis mažiausios sugerties verte, įvertinama kiek reikia pilti supernatanto ir lizės buferio. Mėginio ir lizės buferio tūris paskaičiuojamas šiomis formulėmis (tūris išreikštas µL):

$$V_{\text{mėginio}} = 450 \times A_{\min} / A_{\text{mėginio}} \quad (1)$$

$$V_{\text{lizės buferio}} = 450 - V_{\text{mėginio}}$$

### 2.2.4 Baltymų denatūracija

Sulyginti baltymų mėginiai sumaišomi su SB (4x) 3:1 santykiu - 450 µL mėginio maišoma su 150 µL SB. Mėginiai kaitinami termostate 5 min, 95°C. Po kaitinimo mėginiai atvėsunami kambario temperatūroje ir perkeliama į -20°C temperatūrą.

### 2.2.5 Baltymų elektroforezė (SDS-PAGE)

Iš pradžių sustatomi du stiklai ir rėmelis, kuriame bus ruošiami geliai. Analizei pasirinktas gelio storis – 1 mm. Pasigaminamas skiriančiojo gelio tirpalas, jo pilama maždaug 2,5 cm iki mažesniojo stiklo viršaus. Iškart po gelio tirpalo supylimo, ant viršaus užpilama 600 µL izopropanolio, kuris išlygina gelio pakraštį pašalindamas oro burbuliukus, paliekama gelį sustingti (apie 0,5-1 h). Sustingus skiriamajam geliui, izopropanolis nusiurbiamas, likučiai sugeriami filtriniu popieriumi. Tuomet pagaminamas koncentruojantis gelis, tirpalas supilamas ant koncentruojančiojo gelio iki mažesnio stiklo viršaus, iškart įstatomos šukos.

Pasiruošiamas elektroforezės buferis, į elektroforezės vonelę sustatomi geliai. Elektroforezės buferiu iki šukų viršaus užpildoma kamera tarp gelių ir vonelė iki nurodytos

atžymos (priklausomai nuo gelių kiekio). Atsargiai ištraukiamos šukos, į šulinėlius supilama 2-3 µL dažyto baltymų markerio ir po 20 µL kambario temperatūroje atšildytų mėginių (paruošti 2.2.2 - 2.2.4 metodais). Pasirenkama 120-140 V įtampa, įjungiami elektros srovė, paliekama apie 1,5 h, kol baltymų fronto linija pasiekia gelio apačią.

SDS-PAGE metodu visi į gelio šulinėlius užnešti baltymai dėl SDS įgyja neigiamą krūvį ir juda link teigiamai įkrauto elektrodo, iš gelio viršaus į apačią. Dėl skirtingos baltymų molekulinės masės jų judėjimo greitis yra skirtingas – didesni baltymai juda lėčiau, todėl išsidėsto gelio viršuje, maži baltymai juda greičiau ir išsidėsto gelio apatinėje dalyje.

### **2.2.6 Pusiaus sausa baltymų pernaša ant membranos**

Kol vyksta elektroforezė, pasirošiamas pernašos buferis, išsikerpama skiriamą gelio matmenis atitinkanti membrana ir vatmano gabalėliai (1 geliui reikalingi 6 vatmano gabalėliai). Į 2 skirtingus indelius įpilama pernašos buferio, į vieną jų pamerkiama membrana, į kitą vatmano gabalėliai, mirkoma 15 minučių,

Pasibaigus elektroforezei, ištraukiamas gelis, mentele nugnybiama koncentruojančioji dalis, toliau naudojama tik skiriančioji dalis.

Ant pernašos aparato sudedamas pernašos „sumuštinis“ – 3 vatmano gabalėliai, membrana, skiriantysis gelis ir dar 3 vatmano gabalėliai. Vatmano gabalėliai dedami po vieną, kiekvieną kartą išstumiant oro burbuliukus ir užpilant šiek tiek pernašos buferio. Tuomet atsargiai padedama membrana ir gelis, po to vėl vatmano gabalėliai. Pernašos aparato dangtis dedamas stačiai, dangtis prislegiamas sunkiu daiktu. Svarbu, kad pernašos metu aparatas būtų vėsinamas, jog neišsilydytų gelis. Pernaša vykdoma 33 min, nustačius pastovią 25 V įtampos srovę (*ThermoFisher Scientific Inc.*, 2013).

### **2.2.7 Imunoblotingas**

Kol vyksta baltymų pernaša ant membranos, pasirošiamas blokavimo tirpalas. Po pernašos membrana iškart perkeliama į blokavimo tirpalą ir paliekama 1 val. ant purtyklės. Blokavimo etapo esmė – padengti visą membranos paviršių baltymais ir išvengti nespecifinio pirminių antikūnų jungimosi prie membranos paviršiaus.

Blokuojantis membranai, pasirošiami pelės arba triušio pirminiai antikūnai prieš dominantį baltymą. Po blokavimo membrana pincetu perkeliama į užspaudžiamą maišelį, į jį supilamas pirminių antikūnų tirpalas. Membrana su pirminiais antikūnais paliekama +4°C per naktį, arba kambario temperatūroje 1 val., maišelį pamaigant tarp pirštų.

Po poveikimo pirminiais antikūnais, membrana plaunama 3 kartus po 5 min plovimo tirpale ant purtyklės, pasirošiamas antrinių antikūnų tirpalas. Nuplauta membrana perkeliama į tirpalą su paruoštais antriniais antikūnais. Priklausomai nuo to, buvo naudoti pelės ar triušio pirminiai antikūnai, naudojami antriniai antikūnai prieš pelės arba triušio IgG. Membrana antrinių antikūnų tirpalu veikiama 1 val. ant purtyklės, tada vėl plaunama 3 kartus po 5 min plovimo tirpale.

Membranos perkeliama ant skaidraus padėklo ir ant jų užpilamas ryškinimo tirpalas. Analizei naudojami antriniai antikūnai yra konjuguoti su krienų peroksidaze (HRP), kuri vykdo chemoluminescencinę reakciją reaguodama su ryškinimo tirpalu. Ant membranos paviršiaus detektuojamos švytinčios zonos, kuriose prisijungė antrinis antikūnas – matomos juostelės su tiriamuoju baltymu. Remiantis juostelių ryškumu, galima santykinai įvertinti to baltymo kiekį skirtinguose mėginiuose. Tiriamojo baltymo kiekio palyginimas galimas tuo atveju, jei mėginiuose taip pat yra įvertintas ir kontrolinis baltymas (šiuo atveju naudotas GAPDH), kurio kiekis mėginiuose turi būti vienodas.

### **2.2.8 PA hidrogelių gamyba**

Iš pradžių pasirošiami hidrofilišką paviršių turintys apvalūs stikliukai. 12mm apvalūs stikliukai 1 kartą nuplaunami distiliuotu vandeniu, nusausinami arba paliekami išdžiūti. Stikliukai sudedami ant kaitinimo plytelės, ant kiekvieno stikliuko atsargiai užpilama po 200  $\mu$ L 0.033 N NaOH tirpalo. Stipriai nekaitinant, stikliukai paliekami, kad nugaruotų vanduo, ant jų lieka balta apnaša. Tuomet stikliukai traukos spintoje aplašinami APTES, kad stikliuko visas paviršius pasidengtų plonu sluoksniu, palaikoma 5 min. Po poveikio stikliukai plaunami 3 kartus po 5 minutes, jei reikia atsargiai patrinant, kad ant paviršiaus neliktų geltonų APTES nuosėdų. Po plovimo, 30 minučių laikoma 0,5% glutaraldehido tirpale (glutaraldehydas ruošiamas PBS pagrindu). Po poveikio glutaraldehydu, stikliukai vėl plaunami 3 kartus po 5 minutes, paliekami išdžiūti. Tuomet pasirošiami hidrofobiniai kvadratiniai 16mm stikliukai: traukos spintoje ant stikliukų atsargiai užlašinamas CMS, kad pasidengtų stikliukų paviršius, 1 min palaikoma traukos spintoje, kad skystis nugaruotų, stikliukai atsargiai nuvalomi ir plaunami vandeniu. Vanduo turėtų prie stikliukų nelipti. Stikliukai paliekami išdžiūti. Tiek hidrofiliniai, tiek hidrofobiniai stikliukai paruošti gelių gamybos etapui.

Pasirošto norimo kietumo gelio and apvalaus hidrofiliško stikliuko pilama po 23 $\mu$ L, atsargiai uždedamas hidrofobiškas kvadratinis stikliukas, vengiama oro burbulų susidarymo. Stikliukai paliekami apie 30 min – 1 val., kur susipolimerizuotų gelis. Praėjus šiam laikui, nuimami kvadratiniai stikliukai, apvalūs stikliukai su geliais perkeliama į 12 duobučių

plokštelę, 3 kartus po 5 min plaunama PBS tirpalu. Tuomet stikliukai su nuplautais geliais perkeliama į sausą plokštelę, prietemoje ant kiekvieno gelio užlašinamas sulfo-SANPAH tirpalas, laikoma 20 min po UV lempa. Tada geliai plaunami 3 kartus po 5 minutes PBS tirpale, vengiant ryškios šviesos. Po plovimo PBS nusiurbiamas, užpilama po 500 µL 0.2% želatinos tirpalo ir paliekama per naktį 37°C temperatūroje. Sekančią dieną, želatinos tirpalas nusiurbiamas, vėl plaunama 3 kartus PBS tirpale, tuomet stikliukai paliekami PBS tirpale po UV lempa 1,5 val. Po šio UV poveikio, geliai jau paruošti ląstelių išsėjimui.

### **2.2.9 Ląstelių išsėjimas ant gelių**

Ląstelių monosluksnis pakeliamas nuo flakonų paviršiaus, pasiruošiamos reikiamo ląstelių tankio suspensijos. Paruošti geliai perkeliama į naujas 24 duobučių plokšteles, į kiekvieną šulinėlį pilama po 1 ml ląstelių suspensijos.

### **2.2.10 Ląstelių morfologijos palyginimas**

Ląstelių morfologijos palyginimui atlikti, buvo pasiruošta  $4 \times 10^4$  ląstelių suspensija. Ląstelės išsėtos ant gelių ir paliktos termostate, 37°C, 24 val. Praėjus šiam laikui, ląstelės fotografuojamos, gautose nuotraukose įvertinamas jų ilgio ir pločio santykis ImageJ programa, įvertinama bent 100 ląstelių kiekvienam tiriamam taškui.

### **2.2.11 Ląstelių paveikimas doksorubicinu**

Poveikiui doksorubicinu pasiruošta ląstelių suspensija  $4 \times 10^4$  ląstelių/mL. Pirmas 24 val. ląstelės inkubuojamos 37°C be poveikio, po 24 val. terpė nusiurbiamas, pakeičiama į terpę su doksorubicinu, kurio koncentracija 15 µM. Ši doksorubicino CL50 koncentracija parinkta remiantis anksčiau laboratorijoje atliktais MCF-7 tyrimais (Jasmontaitė, 2019). Doksorubicino toksinis poveikis įvertinamas po 48 ir 72 valandų nuo ląstelių užsėjimo ant gelių. Gyvybingumas įvertinamas tripano mėlio dažu arba MTT reagentu.

### **2.2.12 Imunocitocheminis tyrimas**

Ląstelės išsėjamos ant gelių, paliekamos dienai, kad prikibtų. Sekančią dieną nusiurbiamas terpė, ląstelės švelniai nuplaunamos PBS tirpalu, tuomet ląstelės užpilamos 4% paraformaldehidu (paruoštas 1x PBS tirpale) ir fiksuojamos 15-20 min kambario temperatūroje. Tuomet po fiksacijos 2 min plaunama PBS, po to vykdoma ląstelių permeabilizacija - laikoma kambario temperatūroje 1-5 min 0.1% Triton X-100 tirpale (skiestas 1x PBS). Tada vėl plaunama 5 min PBS. Siekiant sumažinti foninį švytėjimą, ląstelės palaikomos 30 min. 1% jaučio albumino tirpale, kambario temperatūroje.

Pasiruošiami pirminiai antikūnai (prieš vinkuliną) blokavimo tirpale, jais ląstelės viekiamos 1 val. kambario temperatūroje. Tada plaunama 3 kartus, po 5-10 min PBS tirpale.

Pasiruošiamas antrinis antikūnas (Gt x Ms, konjuguotas su FITC) 1x PBS tirpale prieš inkubuojant. Ląstelės inkubuojamos su antriniais antikūnais 30-60 min kambario temperatūroje. Dvigubam pažymėjimui, kartu su antriniu antikūnu gali būti veikiama ir TRITC konjuguotu faloidinu. Po inkubacijos plaunama 3 kartus po 5-10 min PBS.

Pasirinktina po plovimo etapo galima nudažyti ir branduolį, paveikiant DAPI 1-5 min kambario temperatūroje. Tada vėl plaunama po 5-10 min 3 kartus. Ląstelių fluorescencijos atvaizdai gaunami fotografuojant fluorescentiniu mikroskopu.

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

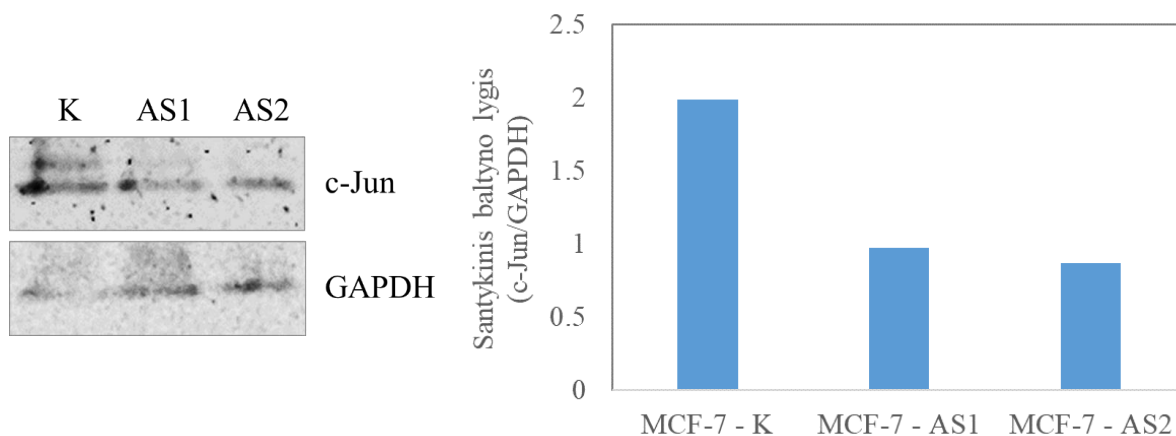
Užląstelinės aplinkos kietumo dinamika yra gyvybiškai svarbi fizinė savybė, lemianti ląstelės likimą ir jos funkcijas, dalyvauja reguliacijoje daugelio svarbių ląstelės procesų, tokių kaip: ląstelės proliferacija, migracija, plitimas, morfologija ir kamieninių ląstelių diferenciacija (Sunyer *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015; Mih *et al.*, 2011). Kintant ląsteles supančios aplinkos kietumui, kinta ir baltymų raiška, pvz. didėja fosforilintų MAPK kinazių p-ERK1/2, p-JNK ir p-p38 raiška (Liu *et al.* 2020). Šie rezultatai taip pat patvirtinami ir mūsų skyriuje atliktais eksperimentais su MCF-7 ląstelėmis – buvo parodyta, kad mažėjant aplinkos kietumui, mažėja MAPK baltymų raiška. Vertinant ląstelių atsaką į doksorubicino poveikį, kai MCF-7 ląstelės buvo auginamos ant skirtingo kietumo PA hidrogelių, nustatytas svarbus JNK vaidmuo. Įvertinus tiek JNK, tiek kitų MAPK – ERK, p38 MAPK – vaidmenį, buvo nustatyta, kad visos jos yra atsakingos už žūties inicijavimą ląstelėms augant ant minkštų paviršių (Jasmontaitė, 2019).

Šiame darbe siekta detaliau įvertinti galimus molekulinis mechanizmus, svarbius reguliuojant/stiprinant chemoterapinio vaisto doksorubicino terapinį veikimą. Šio darbo tiriamasis baltymas – transkripcijos veiksnys c-Jun, kuris yra pagrindinis MAPK JNK taikinyš branduolyje. Jį fosforilinti ir aktyvinti gali ir MAPK, pvz. ERK. (Qin *et al.*, 2015; Jiao *et al.*, 2010; Vleugel *et al.*, 2006). Siekiant įvertinti šio transkripcijos veiksnio vaidmenį ląstelėms, atsakant į Dox poveikį bei ląstelės supančios aplinkos pokyčius, buvo moduluojamas c-Jun raiškos lygis ląstelėse. Tuo tikslu, buvo atliktas c-Jun priešrasminės sekos įvedimas panaudojant konstrukta su protoonkogeno c-Jun seka atvirkštinėje orientacijoje promotoriaus atžvilgiu, kuris buvo paruoštas Ląstelės molekulinės biologijos laboratorijoje (VU GMC Biochemijos Institutas). Konstrukte panaudota Moloney pelės leukemijos retrovirusų ilgos pasikartojančios sekos (LTR) (3.1 pav.).



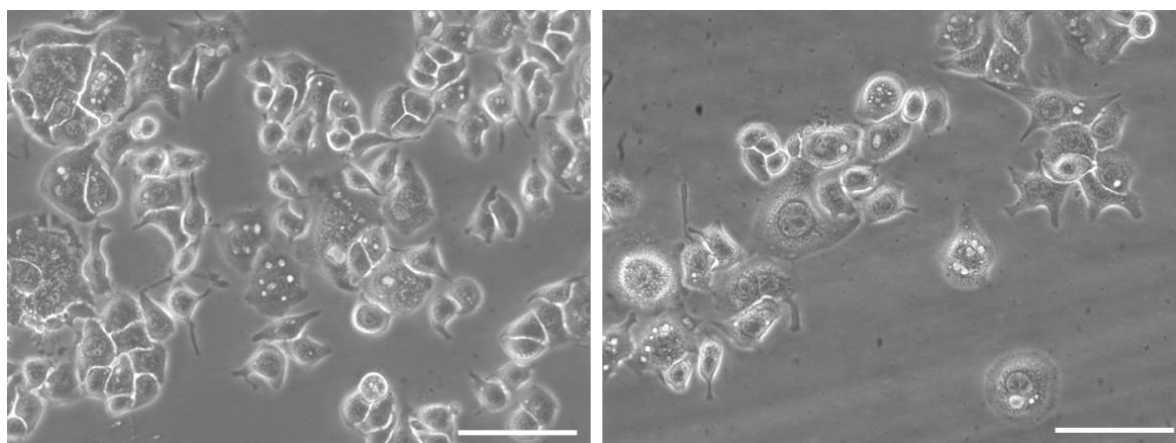
**3.1 pav. Eukariotinio ekspresijos vektoriaus su protoonkogeno c-jun seka konstruktas.**

Gautose transfekuotose *antisense* (AS) ląstelių linijose turėtų būti blokuojama c-Jun baltymo sintezė. Imunoblotingo metodu patikrinę c-Jun ekspresiją nustatėme, kad ji yra žymiai sumažėjusi, tačiau nėra pilnai blokuojama (3.2 pav.).



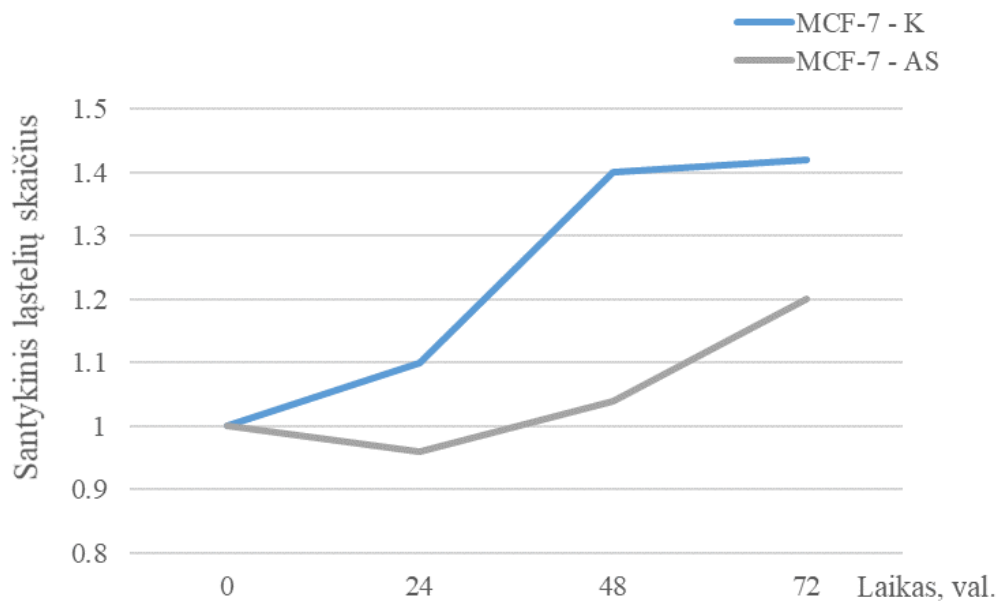
**3.2 pav. c-Jun raiška kontrolinėse bei transfekuotose MCF-7 ląstelėse.** Kairėje pusėje pateikta kokybinis c-Jun baltymo lygio vertinimas imunoblotingo metodu. Dešinėje kiekybinis baltymo lygio palyginimas kontrolinėse ir dviejose transketuotų MCF-7 ląstelių populiacijose.

Toliau palyginome, ar mūsų atlikta c-Jun baltymo lygio moduliacija turėjo įtakos ląstelių morfologijai ir proliferacijai. Įvertinus ląstelių morfologiją (3.3 pav.), nenustatėme, kad c-Jun lygio sumažinimas būtų turėjęs įtakos ląstelių formai ar dydžiui.



**3.3 pav. Kokybinis kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių morfologijos palyginimas.** Kairėje pateiktos MCF-7 kontrolinės ląstelės, dešinėje – MCF-7 AS. Mastelis – 100  $\mu$ m.

Iš literatūros duomenų gerai žinoma, kad c-Jun raiška yra nustatoma įvairių tipų ląstelėse. Šio baltymo lygis paprastai padidėjo po įvairios kilmės poveikių. C-Jun, kaip transkripcijos faktorius, dalyvauja reguliuojant ląstelių proliferaciją aktyvindamas transkripciją genų, atsakingų už ląstelės ciklo slinktį – nustatyta, kad inhibavus c-Jun, ląstelės išeina iš ląstelės ciklo. Taigi, toliau vertinome, ar mūsų atlikta modifikacija c-Jun atžvilgiu turi įtaką MCF-7 ląstelių dauginimuisi (3.4 pav.). Ir iš tiesų, mūsų gauti duomenys patvirtino, kad krūties vėžio ląstelės, kuriose yra sumažintas c-Jun baltymo lygis, dauginosi lėčiau.

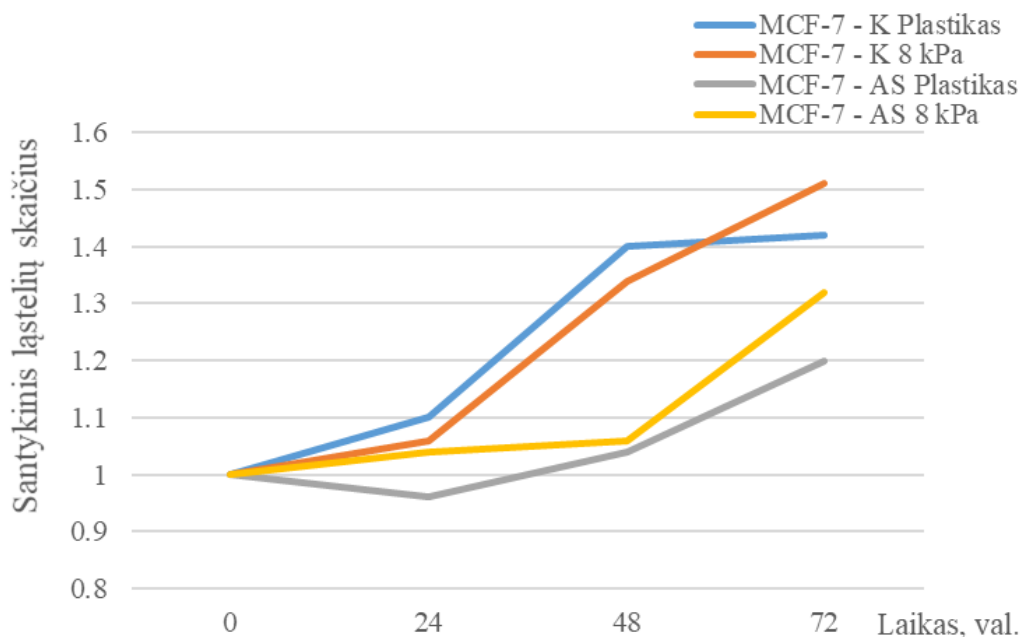


**3.4 pav. Kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių dauginimosi intensyvumo palyginimas.**

Ankstesniais tyrimais mūsų grupė buvo nustačiusi, kad kai MCF-7 ląstelės auginamos ant vidutinio kietumo hidrogelių, jos dauginasi intensyviau už ant kieto, plastiko auginamas ląsteles (Jasmontaitė, 2019). Lovitt *et al.* lygino MCF-7 ląstelių populiacijos padvigubėjimo indeksą, kai ląstelės buvo auginamos 2D bei 3D aplinkoje ir nustatė, kad 3D aplinkoje šis indeksas yra beveik 3,5 karto didesnis. Tačiau kartu pastebėjo, kad 2D ir 3D aplinkoje auginamų ląstelių skaičius intensyviau didėjo trumpuoju laikotarpiu, o bendrai vertinant 3D aplinkoje MCF-7 ląstelių proliferacija nebuvo tokia intensyvi (Lovitt *et al.*, 2018). Taigi, žinant užląstelinės aplinkos įtaką ląstelių proliferacijai ir c-Jun baltymo vaidmenį šiame procese, toliau įvertinome, ar auginant MCF-7 ląsteles su sumažintu c-Jun baltymo lygiu ant vidutinio kietumo (8 kPa) hidrogelių, jų proliferacinis aktyvumas suintensyvės. Šiame darbe

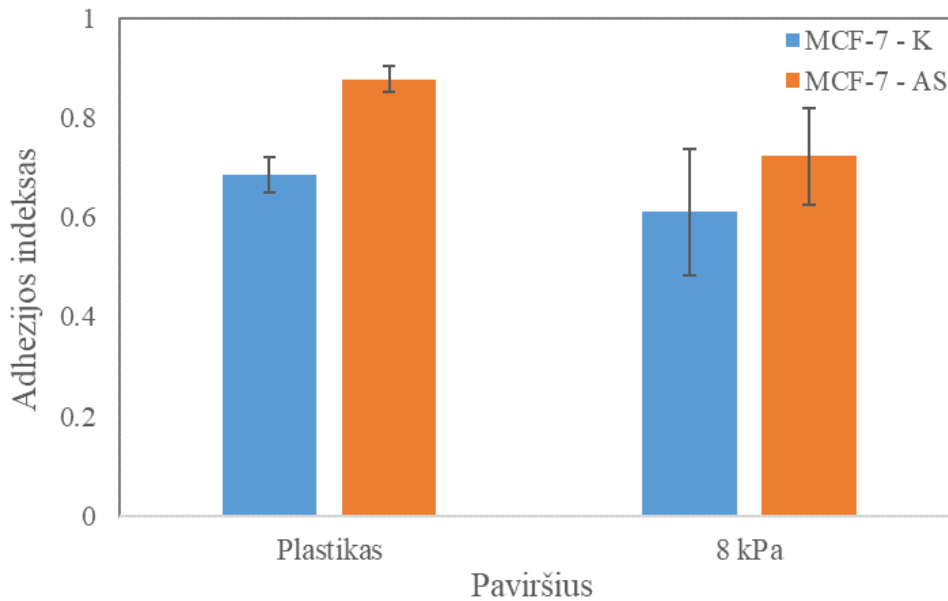


pasirinkome vieno kietumo tipo hidrogelį – 8 kPa. Tokio kietumo mikroaplinka susidaro vystantis krūties navikui. Palyginę dauginimosi intensyvumą kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių, augintų ant tiriamo 8 kPa kietumo hidrogelių ir plastiko paviršiaus, nustatėme, kad ląstelės su sumažintu c-Jun baltymo lygiu ant hidrogelio pradeda daugintis intensyviau, tačiau kontrolinių ląstelių lygio nepasiekia (3.5. pav.).



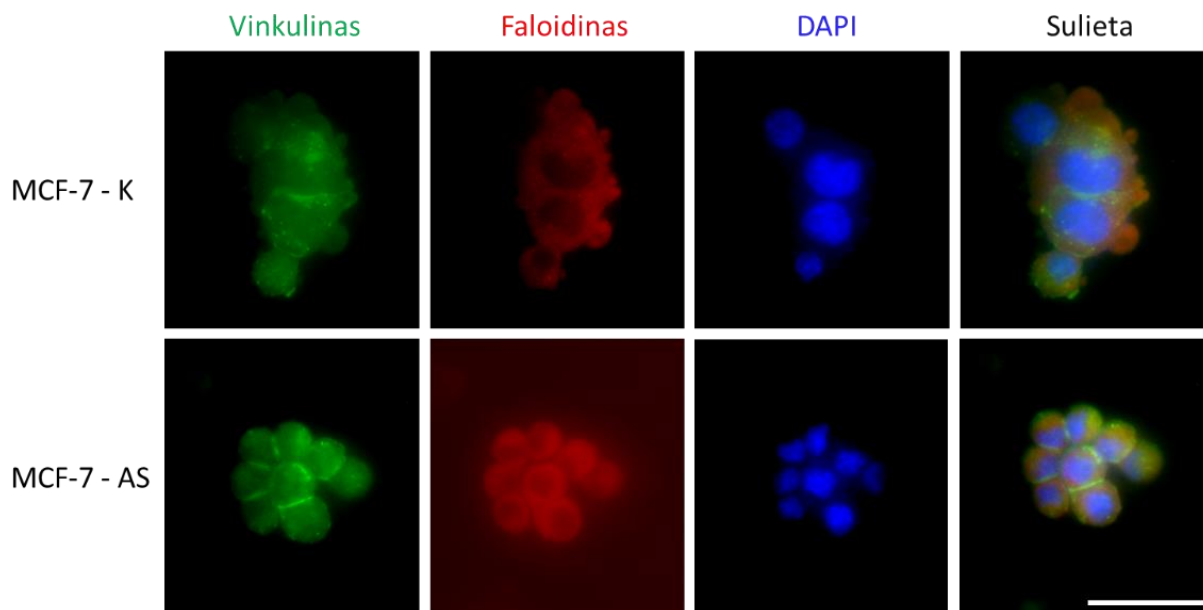
**3.5 pav. Kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių dauginimosi intensyvumo palyginimas ant 8 kPa kietumo hidrogelio ir plastiko paviršiaus.**

Kitas svarbus aspektas vertinant ląstelių, įskaitant ir vėžinių, savybes yra adhezijos stiprumas. Ši savybė labai svarbi vystantis metastazėms – susilpnėjus ląstelių tarpusavio kontaktams ir kontaktams su užląsteline aplinka, ląstelės atsipalaiduoja ir joms įprastos aplinkos, įgyja migracinę potencialą – visa tai lemia metastazių susidarymą. Todėl šiame darbe vertinome, kaip kinta ląstelių adhezijos stiprumas jas auginant ant vidutinio kietumo hidrogelio. Nustatėme, kad ant hidrogelio auginamų MCF-7 ląstelių adhezijos stiprumas yra šiek tiek mažesnis, nei joms augant ant plastiko paviršiaus. Šiuo atveju, MCF-7 ląstelės su sumažintu c-Jun baltymo lygio stipriau buvo prikibusios prie tiriamų paviršių (3.6 pav.). Todėl tikėtina, kad moduluojant c-Jun baltymo lygį, galima būtų sumažinti krūties vėžio ląstelių metastazinį potencialą.



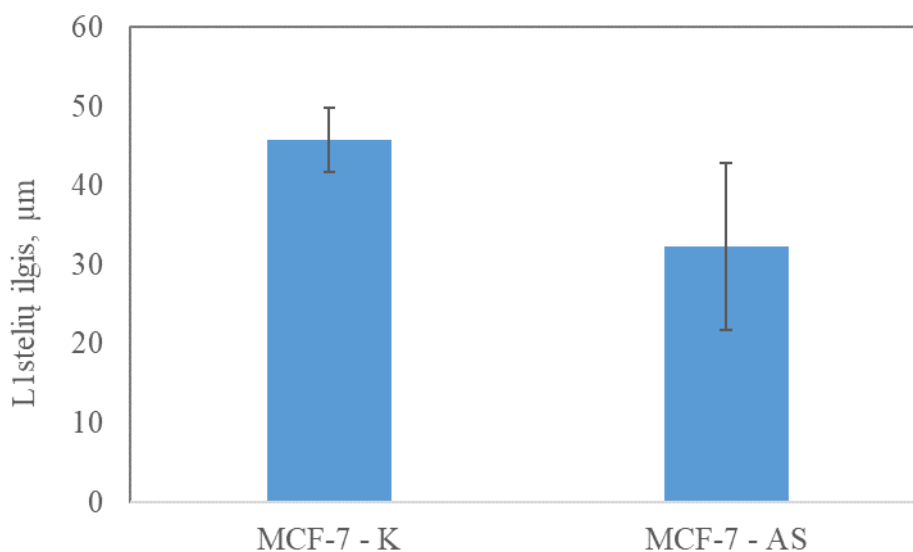
**3.6 Pav. Kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių adhezijos stiprumo palyginimas ant 8 kPa kietumo hidrogelio ir plastiko paviršiaus praėjus 24 val. nuo ląstelių išsėjimo ant tiriamų paviršių.**

Ląstelėms sąveikaujant su užląsteline aplinka labai svarbų vaidmenį atlieka sutelktinio sąlyčio taškai – sudėtingos baltymų sancaupos, atsakingos už ląstelių adheziją. Vieni iš sutelktinio sąlyčio komponentų – integrinai atlieka tarpininko funkciją tarp ląstelės citoskeleto bei viduląstelinų signalinių molekulių ir užląstelinėje aplinkoje esančių baltymų, proteoglikanų ir kt. ligandų. Todėl sutelktinis sąlytis svarbus ir reguliuojant kitas svarbias ląstelių savybes – proliferaciją, judėjimą, net genų raišką. Todėl tolesnėje darbo dalyje siekėme palyginti, ar skiriasi kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių sudaromų sutelktinių sąlyčių kiekis. Iš 3.7 pav. pateikiamų duomenų matome, kad ryškesnių skirtumų tarp abiejų tirtų ląstelių populiacijų nėra – sutelktiniai sąlyčiai susikaupę tiek tarpląstelinės sąveikos vietoje, tiek sąveikos su hidrogeliu riboje.



**3.7 pav. Sutelktnio sąlyčio vertinimas kontrolinėms ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelėms augant ant 8 kPa poliakrilamidinio gelio. Mastelis – 100  $\mu\text{m}$ .**

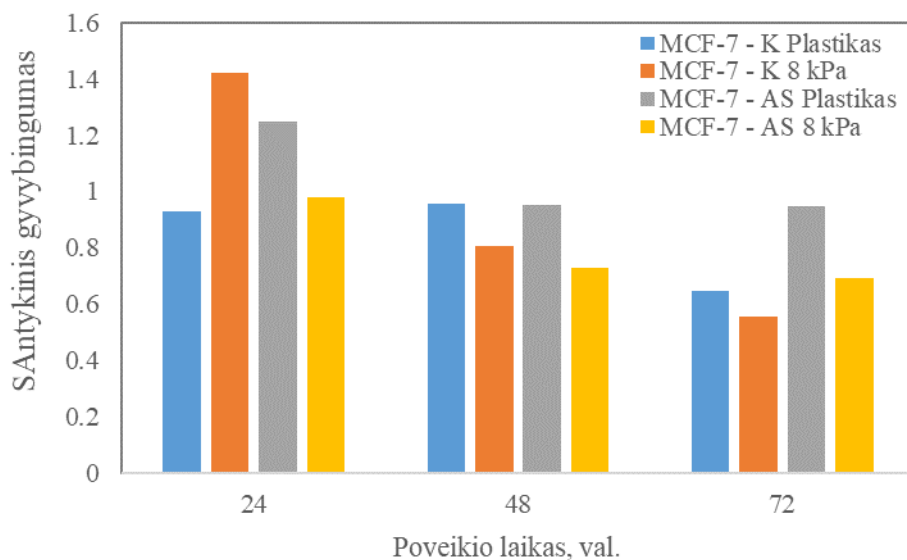
Ant plokščio paviršiaus 2D aplinkoje auginamos ląstelės suformuoja sąveikas su užląsteline aplinka viena ląstelės puse. Todėl siekiamos užtikrinti tinkamą sukibimą su paviršiumi, jos paprastai yra linkusios užimti didesnę plotą ir įgauti tam tikram ląstelių tipui būdingą morfologiją. Tai stebėjome vertindami kontrolinių ir su sumažintu c-Jun lygiu MCF-7 ląstelių morfologiją, jas išsėjus ant plastiko paviršiaus (3.3 pav.). Tačiau kai ląstelės išsėjamos ant vidutinio kietumo hidrogelio, jos sąveikauja su užląsteline aplinka, kuri pasižymi kiek kitomis savybėmis nei kietas 2D paviršius. Užląstelinės aplinkos įtaką galėjome stebėti ir vertindami sutelktnio sąlyčio taškus, ląsteles išsėję ant poliakrilamidinio gelio (3.7 pav.). Net ant gelio, kurio Young`o modulis yra 8 kPa, mūsų tirtos ląstelės buvo linkusios įgauti morfologiją, kuri būdinga ląstelėms esančioms 3D aplinkoje, kurioje jos sudaro jungtis su užląsteline aplinka visu savo paviršiumi. Tai paskatina jų suapvalėjimą ir užimamo ploto sumažėjimą – ląstelės tampa apvalesnėmis. Tai ir stebėjome 3.7 paveiksle. Siekdami detaliau įvertinti ląstelių formą, įvertinome ląstelių ilgį, kuris buvo lygus ląstelių plotui, todėl kiekybiniam vertinimui pasirinkome vieną dydį. Duomenis pateikiame 3.8 paveiksle.



**3.8 pav. Kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių ilgio palyginimas, kai tiriamos ląstelės buvo išsėtos ir 24 val. augintos ant 8 kPa poliakrilamidinio gelio.**

Žinoma, kad protoonkogenas c-Jun dalyvauja apoptozės indukcijoje (Kim et al., 2000). O tikslinė vėžinių ląstelių žūtis yra svarbi ieškant optimalių vėžio gydymo strategijų. Toliau vertinome, ar c-Jun lygio pakeitimas, turi įtakos MCF-7 ląstelių atsakui į vieno iš chemoterapinių vaistų – doksorubicino – poveikį. Doksorubicinas yra vienas iš plačiai krūties vėžio gydymui naudojamų vaistų. Nepaisant to, kad šio vaisto veikimas yra plačiai tyrinėjamas, tačiau atsparyumo jam molekuliniai mechanizmai dar nėra iki galo išaiškinti. Pastaruoju metu įvairios tyrėjų grupės vis labiau kreipia dėmesį į užląstelinės aplinkos vaidmenį rezistentiškumo vystymesi. Bustatyta, kad krūties vėžio vystymosi metu navikinis audinys pasižymi didesniu kietumu nei sveikas audinys. Mūsų gauti rezultatai (3.5 pav.) rodo, kad ant kieto paviršiaus krūties vėžio MCF-7 linijos ląstelės yra linkusios daugintis intensyviau. Šiame darbe stengimės įvertinti du kintamuosius – aplinkos kietumą ir transkripcijos veiksnį c-Jun – bei jų vaidmenį doksorubicino poveikio metu. Tyrimams pasirinkome 20 µM doksorubicino koncentraciją, kuri mūsų ankstesniuose tyrimuose per 48-72 poveikio valandas indukavo 50 proc. ląstelių žūtį. Tiriama doksorubicino koncentracija paveikė kontrolines ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląsteles nustatėme, kad ląsteles auginant vidutinio kietumo hidrogelio jos yra jautresnės doksorubicino poveikiui nei ant kieto, plastiko paviršiaus auginamos ląstelės. Tačiau c-Jun baltymo lygio sumažinimas šiuo atveju reikšmingesnės įtakos neturėjo (3.9 pav.). Šie rezultatai pasirodė įdomūs ir gana netikėti, nes gerokai anksčiau buvo nustatyta, JNK/SAPK signalinis kelias, kurio pagrindinis

taikyns branduolyje yra c-Jun, tiesiogiai dalyvauja MCF-7 ląstelių ciklo stabdyje bei apoptozės indukcijoje po doksorubicino poveikio. Mūsų gautų rezultatų patvirtinimui ir užląstelinės aplinkos įtakos detalesniam įvertinimui reikalingi tolimesni tyrimai.



**3.9 pav. Kontrolinių ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelių adhezijos jautrumo doksorubicinui vertinimas, ląsteles auginant ant 8 kPa kietumo hidrogelio ir plastiko paviršiaus. Doksorubicinas (20 μM) buvo pridedamas praėjus 24 val. nuo ląstelių išsėjimo ant tiriamų paviršių. Poveikis vertintas praėjus 24, 48 bei 72 valandoms.**

Tai, kad užląstelinė aplinka gali moduluoti krūties vėžio ląstelių atsaką į doksorubicino poveikį, patvirtina ir kitų autorių darbai. Lovitt *et al.* (2018) tyrė, kaip kinta krūties vėžio ląstelių atsakas į doksorubiciną, priklausomai nuo ekstraląstelinio matrikso sudėties. Jų gauti rezultatai parodė, kad atsakui į doksorubicino poveikį ekstraląstelinio matrikso komponentai gali būti svarbūs, bet tai priklauso nuo tiriamų ląstelių tipo. Autoriai daro išvadą, kad sąveika su užląsteline aplinka gali dalyvauti vystantis atsparumui chemoterapiniams vaistams. Mūsų tyrimų metu buvo gauti rezultatai, rodantys, kad vidutinio kietumo aplikoje sustiprėja ląstelių adhezija ir padidėja ląstelių jautrumas doksorubicinui. Tai rodo, kad ne tik užląstelinės aplinkos komponentai, bet ir jos fizikinės savybės taip pat gali būti svarbios vystantis atsparumui chemoterapiniams vaistams.

## Išvados

Panaudojus virusinį vektorių su priešprasmine c-Jun seka, gautos MCF-7 linijos ląstelės su sumažintu c-Jun baltymo lygiu, kurių morfologija nesiskyrė nuo kontrolinių ląstelių, tačiau dauginimosi intensyvumas buvo nežymiai (apie 1,2 karto) mažesnis.

MCF-7 ląstelės su sumažintu c-Jun baltymo lygiu ant 8 kPa hidrogelio dauginosi intensyviau, tačiau kontrolinių ląstelių dauginimosi greičio nepasiekė. c-Jun baltymo lygis turi įtakos ir ląstelių adhezijai - MCF-7 ląstelių su sumažintu c-Jun baltymo lygiu sąveika tiek su plastiko, tiek su 8 kPa hidrogelio paviršiais buvo stipresnė.

Kontrolines ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu ląsteles auginant vidutinio kietumo (8 kPa) hidrogelio jos buvo jautresnės doksorubicino poveikiui nei ant kieto, plastiko paviršiaus auginamos ląstelės. Tačiau c-Jun baltymo lygio sumažinimas šiuo atveju reikšmingesnės įtakos neturėjo.

Sutelktinio sąlyčio taškų kiekis kontrolinėse ir su sumažintu c-Jun baltymo lygiu MCF-7 ląstelėse, auginamose ant 8 kPa hidrogelio, nesiskyrė, tačiau ant hidrogelio augintos abiejų tipų ląstelės buvo linkusios apvalėti. Kontrolinės ląstelės ant hidrogelio buvo 1,4 karto ilgesnės už ląsteles su sumažintu c-Jun baltymo lygiu.

## Santrauka

### Transkripcijos veiksnio c-Jun vaidmuo krūties vėžio MCF-7 linijos ląstelėms atsakant į aplinkos kietumo pokyčius

Krūties vėžys – viena labiausiai paplitusių vėžinių formų, kuria beveik be išimčių serga moterys. Nors yra atrasta ne viena terapija prieš krūties vėžį, atsparumo išsivystymas terapijai ir auglio atsinaujinimas išlieka didele problema. Yra pastebėta, kad formuojantis vėžiniam dariniui, kietėja aplink jį esanti mikroaplinka – taip sukuriama palankesnė sąlyga ląstelėms vykdyti aplinkinio audinio invaziją ir metastazes. Dėl ląstelių jautrumo mechaniniams aplinkos pokyčiams, aplinkos kietėjimas daro įtaką ląstelės formai, judrumui, į kamieninį-panaušaus fenotipo susidarymui. Poliakrilamidiniai geliai – patogus įrankis, kuriant skirtingo kietumo aplinkas. Jais galima imituoti užląstelinę matriksą, atitinkantį sveiko ir vėžinio audinio kietumus in vitro ląstelių tyrimuose. c-Jun – transkripcijos veiksnys, kuris yra reguliuojamas MAPK signalinių kaskadų ir galimai prisidedantis prie YAP/TAZ koordinuojamo nuo aplinkos kietumo priklausančio ląstelių migracijos ir proliferacijos atsako. Šiuo darbu siekta sukurti skirtingu c-Jun raiškos lygiu pasižyminčias krūties vėžio MCF-7 ląsteles ir palyginti jų morfologinius bei elgsenos pokyčius, atsakant į skirtingą aplinkos kietumą.

## **Abstract**

### **Role of c-Jun in Response of MCF-7 Cells to the Stiffness' Alterations of Surrounding Environment**

Breast cancer – one of the most common cancer forms, and it is mostly diagnosed among women. Although there are some therapies designed against some forms of breast cancer, developed resistance to drugs and tumour renewal are big issues. It was observed, that extracellular matrix around a tumour becomes stiffer comparing to a healthy tissue nearby. In this way, tumour formation creates favourable conditions, which let cancerous cells to develop invasive and metastatic phenotypes. Because of cells' sensitivity to mechanical signals, level of surrounding environment's stiffness influences cell shape, motility and formation of stem cell-like phenotypes. Polyacrylamide gels – useful tool to create different stiffness environments, which may mimic physical properties of healthy and cancerous tissue for *in vitro* cell studies. c-Jun – transcription factor, which is regulated by MAPK signal cascades and possibly participates in cell's migration and proliferation responses dependent on environment stiffness, together with transcription cofactors YAP/TAZ. This study's goal was to compare morphology and behavior differences, depending on different environment stiffness and different expression level of c-Jun.



## Literatūros sąrašas

4. Abe A, Miyanohara, Friedmann T. Polybrene Increases the Efficiency of Gene Transfer by Lipofection. *Gene Ther.* 1998 May;5(5):708-11. doi: 10.1038/sj.gt.3300652.
5. Baguley BC, Leung E. Heterogeneity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines. In: Gunduz M, Gunduz E, editors. *Breast Cancer - Carcinogenesis, Cell Growth and Signaling Pathways*. Rijeka, Croatia:InTech; 2010. Ch. 11.
6. Basakran N. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J.* 2015; 36(3): 273–279.
7. Basu S, Cheriyaundath S, Ben-Ze'ev A. Cell-cell Adhesion: Linking Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling With Partial EMT and Stemness Traits in Tumorigenesis. *F1000Res.* 2018 Sep 18;7:F1000 Faculty Rev-1488.
8. Bauer MS, Baumann F, Daday C, Redondo P, Durner E, Jobst MA, Milles LF, Mercadante D, Pippig DA, Gaub HE, Gräter F, Lietha D. Structural and Mechanistic Insights Into Mechanoactivation of Focal Adhesion Kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Apr 2;116(14):6766-6774.
9. Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) From Breast Carcinoma. *J Biol Chem.* 1973 Sep 10;248(17):6251-3.
10. Cobbaut M, Karagil S, Bruno L, Diaz de la Loza MDC, Mackenzie FE, Stolinski M, Elbediwy A. Dysfunctional Mechanotransduction through the YAP/TAZ/Hippo Pathway as a Feature of Chronic Disease. *Cells.* 2020 Jan; 9(1): 151.
11. Comşa Ş, Cîmpean AM, Raica M. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Res.* 2015 Jun;35(6):3147-54.
12. Cooper GM. *The Development and Causes of Cancer. The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
13. Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. The Power and Potential of doxorubicin-DNA Adducts. *IUBMB Life.* 2005 Feb;57(2):73-81.
14. de los Fayos Alonso IG, Liang HC, Turner SD, Lagger S, Merkel O, Kenner L. The Role of Activator Protein-1 (AP-1) Family Members in CD30-Positive Lymphomas. *Cancers (Basel).* 2018 Apr; 10(4): 93.
15. Dobrokhotov O, Samsonov M, Sokabe M, Hirata H. Mechanoregulation and Pathology of YAP/TAZ via Hippo and non-Hippo Mechanisms. *Clin Transl Med.* 2018 Aug 13;7(1):23.
16. El-Sahli S, Xie Y, Wang L, Liu S. Wnt Signaling in Cancer Metabolism and Immunity. *Cancers (Basel).* 2019 Jul; 11(7): 904.
17. Erik Henke E, Nandigama R, Ergün S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci.* 2019; 6: 160.
18. Eustice DC, Wilhelm JM. Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eucaryotic protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984 Jul; 26(1): 53–60.
19. Fassati A, Dunckley MG, Dickson G. Retroviral vectors. In: Dickson G, editor. *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. Chapman & Hall, 1995. p. 1-19.

20. Fedele M, Cerchia L, Chiappetta G. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Breast Cancer: Focus on Basal-Like Carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2017 Oct; 9(10): 134.
21. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol*. 2013 Dec; 23(12): 620–633.
22. Gazon H, Barbeau B, Mesnard JM, Peloponese Jr JM. Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway During Development of ATL. *Front Microbiol*. 2018 Jan 15;8:2686.
23. Gkretsi V, Stylianopoulos T. Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol*. 2018; 8: 145
24. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. 2020 Mar; 19(3): 1997–2007.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
26. Hao Y, Baker D, ten Dijke P. TGF- $\beta$ -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun; 20(11): 2767.
27. Hastings JF, Joanna N Skhinas JN, Fey D, David R Croucher DR, Cox TR. The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks. *Br J Pharmacol*. 2019 Jan; 176(1): 82–92.
28. Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 Subunits: Quarrel and Harmony Among Siblings. *J Cell Sci*. 2004 Dec 1;117(Pt 25):5965-73.
29. Hwang JH, Byun MR, Kim AR, Kim KM, Cho HJ, Lee YH, Kim J, Jeong MG, Hwang ES, Hong JH. Extracellular Matrix Stiffness Regulates Osteogenic Differentiation through MAPK Activation. *PLoS One*. 2015 Aug 11;10(8):e0135519.
30. Yeh YC, Ling JY, Chen WC, Lin HH, Tang MJ. Mechanotransduction of matrix stiffness in regulation of focal adhesion size and number: reciprocal regulation of caveolin-1 and  $\beta$ 1 integrin. *Sci Rep*. 2017; 7: 15008.
31. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V, Janmey PA. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005 Jan;60(1):24-34. doi: 10.1002/cm.20041.
32. Irene HL Hamelers I HL, van Schaik R FMA, Sussenbach JS, Steenbergh PH.  $17\beta$ -Estradiol responsiveness of MCF-7 laboratory strains is dependent on an autocrine signal activating the IGF type I receptor. *Cancer Cell Int*. 2003; 3: 10.
33. Jagodzick P, Tajdel-Zielinska M, Ciesla A, Marczak M, Ludwikow A. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Front Plant Sci*. 2018 Oct 8;9:1387.
34. Jansen KA, Atherton P, Ballestrem C. Mechanotransduction at the Cell-Matrix Interface. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Nov;71:75-83.
35. Jasmontaitė D. Hidrogelių kietumo įtaka MCF – 7 ląstelėms ir jų atsparumui doksorubicinui [magistrinis darbas]. Vilnius: Vilniaus universitetas; 2019.
36. Jeong Y, You D, Kang HG, Yu J, Kim SW, Nam SJ, Lee JE, Kim S. Berberine Suppresses Fibronectin Expression through Inhibition of c-Jun Phosphorylation in Breast Cancer Cells. *J Breast Cancer*. 2018 Mar; 21(1): 21–27.

37. Jiao X, Katiyar S, Willmarth NE, Liu M, Ma X, Flomenberg N, Lisanti MP, Pestell RG. c-Jun Induces Mammary Epithelial Cellular Invasion and Breast Cancer Stem Cell Expansion. *J Biol Chem.* 2010; 285(11): 8218–8226.
38. Knupp C, Squire JM. Molecular Packing in Network-Forming Collagens. *ScientificWorldJournal.* 2003; 3: 558–577.
39. Kraning-Rush CM, Reinhart-King CA. Controlling Matrix Stiffness and Topography for the Study of Tumor Cell Migration. *Cell Adh Migr.* May-Jun 2012;6(3):274-9.
40. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Jun; 6(6): a027029.
41. Lagares-Tena L, García-Monclús S, López-Alemaný R, Almacellas-Rabaiget O, Huertas-Martínez J, Sáinz-Jaspeado M, Mateo-Lozano S, Rodríguez-Galindo C, Rello-Varona S, Herrero-Martín D, Tirado OM. Caveolin-1 promotes Ewing sarcoma metastasis regulating MMP-9 expression through MAPK/ERK pathway. *Oncotarget.* 2016 Aug 30; 7(35): 56889–56903.
42. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells-Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Mar 31;107(7):dju073.
43. Lee HM, Hwang KA, Choi KC. Diverse Pathways of Epithelial Mesenchymal Transition Related With Cancer Progression and Metastasis and Potential Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Epithelial Mesenchymal Transition Process. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Dec 5;457:103-113.
44. Lee JP, Kassianidou E, MacDonald JI, Francis MB, Kumar S. N-terminal Specific Conjugation of Extracellular Matrix Proteins to 2-Pyridinecarboxaldehyde Functionalized Polyacrylamide Hydrogels. *Biomaterials.* 2016 Sep; 102: 268–276.
45. Leung E, Kannan N, Krissansen GW, Findlay MP, Baguley BC. MCF-7 Breast Cancer Cells Selected for Tamoxifen Resistance Acquire New Phenotypes Differing in DNA Content, phospho-HER2 and PAX2 Expression, and Rapamycin Sensitivity. *Cancer Biol Ther.* 2010 May 1;9(9):717-24.
46. Leung E, Kim JE, Asharian-Amiri M, Finlay GJ, Baguley BC. Evidence for the Existence of Triple-Negative Variants in the MCF-7 Breast Cancer Cell Population. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 836769.
47. Liu QP, Luo Q, Deng B, Ju Y, Song GB. Stiffer Matrix Accelerates Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells Through Enhanced Aerobic Glycolysis Via the MAPK-YAP Signaling. *Cancers (Basel).* 2020;12(2):490.
48. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Doxorubicin resistance in breast cancer cells is mediated by extracellular matrix proteins. *BMC Cancer* 2018; 18:41
49. MacGregor Schafer J, Jordan VC. Models of Hormone Resistance in Vitro and in Vivo. *Methods Mol Med.* 2006;120:453-64.
50. Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol.* 2015;8:23-31.
51. Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. *Madame Curie Bioscience Database.* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.

52. Martino F, Perestrelo AR, Vinarský V, Stefania Pagliari S, Giancarlo Forte G. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol.* 2018; 9: 824.
53. MihJD, Sharif AS, Fei Liu F, Marinkovic A, Matthew M, Symer MM, Tschumperlin DJ. A Multiwell Platform for Studying Stiffness-Dependent Cell Biology. *PLoS One.* 2011;6(5):e19929.
54. Miller AD. PA 317 Retrovirus Packaging Cells. *Mol Ther.* 2002 Nov;6(5):572-5.
55. Miller AD. Retrovirus Packaging Cells. *Hum Gene Ther.* Spring 1990;1(1):5-14.
56. Najafi M, Farhood B, Mortezaee K. Extracellular Matrix (ECM) Stiffness and Degradation as Cancer Drivers. *J Cell Biochem.* 2019 Mar;120(3):2782-2790.
57. Nishimoto M, Uranishi K, Asaka MN, Suzuki A, Mizuno Y, Hirasaki M, Okuda A. Transformation of Normal Cells by Aberrant Activation of YAP via cMyc With TEAD. *Sci Rep.* 2019 Jul 29;9(1):10933.
58. Nukuda A, Sasaki C, Ishihara S, Mizutani T, Nakamura K, Ayabe T, Kawabata K, Haga H. Stiff substrates increase YAP-signaling-mediated matrix metalloproteinase-7 expression. *Oncogenesis.* 2015 Sep; 4(9): e165.
59. *Oncotarget* 2015 Aug 28;6(25):20946-58. Lin HH, Lin HK, Lin IH, Chiou YW, Chen HW, Liu CY, Harn HIC, Chiu WT, Wang YK, Shen MR, Tang MJ. Mechanical Phenotype of Cancer Cells: Cell Softening and Loss of Stiffness Sensing. *Oncotarget* 2015 Aug 28;6(25):20946-58.
60. Pachmayr E, Treese C, Stein U. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. *Visc Med* 2017;33:11-20
61. Pal M, Chen H, Lee BH, Lee JYH, Yip YS, Tan NS, Tan LP. Epithelial-mesenchymal Transition of Cancer Cells Using Bioengineered Hybrid Scaffold Composed of hydrogel/3D-fibrous Framework. *Sci Rep.* 2019 Jun 20;9(1):8997. doi: 10.1038/s41598-019-45384-9.
62. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer *EMBO Rep.* 2014 Dec; 15(12): 1243–1253.
63. Poltavets V, Kochetkova M, Pitson SM, Samuel MS. The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. *Front Oncol.* 2018; 8: 431.
64. Porter CD, Lukacs KV, Box G, Takeuchi Y, Collins MKL. Cationic Liposomes Enhance the Rate of Transduction by a Recombinant Retroviral Vector In Vitro and In Vivo. *J Virol.* 1998 Jun; 72(6): 4832–4840.
65. Qin G, Xu F, Qin T, Zheng Q, Shi D, Xia W, Tian Y, Tang Y, Wang J, Xiao X, Deng W, Wang S. Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer via c-Jun/COX-2 signaling pathway. *Oncotarget.* 2015 Dec 8; 6(39): 41794–41808.
66. Reid SE, Sara Zanivan S. Tumor Stiffness Extends Its Grip on the Metastatic Microenvironment. *Mol Cell Oncol.* 2017 Oct 16;4(6):e1372866.
67. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers (Basel).* 2018 Feb; 10(2): 52.
68. Schneider G, Schmidt-Supprian M, Rad R, Saur D. Tissue-specific tumorigenesis – Context matters. *Nat Rev Cancer.* 2017 Apr; 17(4): 239–253.

69. Seibert K, Shafie SM, Triche TJ, Whang-Peng JJ, O'Brien SJ, Toney JH, Huff KK, Lippman ME. Clonal Variation of MCF-7 Breast Cancer Cells in Vitro and in Athymic Nude Mice. *Cancer Res.* 1983 May;43(5):2223-39.
70. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog.* 2013; 18(1-2): 43–73.
71. Shao J, Teng Y, Padia R, Hong S, Noh H, Xie X, Mumm JS, Zheng Dong Z, Ding HF, Cowell J, Kim J, Han J, Huang S. COP1 and GSK3 $\beta$  Cooperate to Promote c-Jun Degradation and Inhibit Breast Cancer Cell Tumorigenesis. *Neoplasia.* 2013 Sep;15(9):1075-85. doi: 10.1593/neo.13966.
72. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018 Feb; 18(1): 8–20.
73. Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl).* 2010; 4: 35–41.
74. Sun Z, Guo SS, Fässler R. Integrin-mediated mechanotransduction. *J Cell Biol.* 2016 Nov 21; 215(4): 445–456.
75. Sunyer R, Jin AJ, Nossal R, Sackett DL. Fabrication of Hydrogels with Steep Stiffness Gradients for Studying Cell Mechanical Response. *PLoS One.* 2012; 7(10): e46107.
76. Thermo Fisher Scientific Inc. (2013). *Electroblot proteins by wet or semi-dry transfer: Application notes.* Rockford, IL.
77. Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442-454
78. Thompson B. YAP/TAZ: Drivers of Tumor Growth, Metastasis, and Resistance to Therapy. *Bioessays.* 2020 May;42(5):e1900162.
79. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altmana RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Jul; 21(7): 440–446.
80. Tong CWS, Wu M, Cho WCS, To KKW. Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer. *Front Oncol.* 2018 Jun 14;8:227.
81. Vleugel MM, Greijer AE, Bos R, van der Wall E, van Diest PJ. c-Jun Activation Is Associated With Proliferation and Angiogenesis in Invasive Breast Cancer. *Hum Pathol.* 2006 Jun;37(6):668-74. doi: 10.1016/j.humpath.2006.01.022.
82. Wakharde AA, Awad AH, Bhagat A, Karuppayil SM. Synergistic Activation of Doxorubicin against Cancer: A Review. *Am J Clin Microbiol Antimicrob.* 2018; 1(2): 1009.
83. Walker C, Mojares E, Del Río Hernández A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* 2018 Oct 4;19(10):3028.
84. Welsh J. Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Animal Models for the Study of Human Disease.* 2013. Ch. 40, p. 997-1018.
85. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson

- A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 8. <https://www.drugbank.ca/drugs>
86. Wullkopf L, West AKV, Leijnse N, Cox TR, Madsen CD, Oddershede LB, Erler JT. Cancer Cells' Ability to Mechanically Adjust to Extracellular Matrix Stiffness Correlates With Their Invasive Potential. *Mol Biol Cell.* 2018 Oct 1;29(20):2378-2385.
  87. Xie X, Kaoud TS, Edupuganti R, Zhang T, Kogawa T, Zhao Y, Chauhan GB, Giannoukos DN, Qi Y, Tripathy D, Wang J, Gray NS, Dalby KN, Bartholomeusz C, Ueno NT. c-Jun N-terminal kinase promotes stem cell phenotype in triple-negative breast cancer through up-regulation of Notch1 via activation of c-Jun. *Oncogene.* 2017 May 4; 36(18): 2599–2608.
  88. Zaidi Z, Dib HA. Abstract 4191: The worldwide female breast cancer incidence and survival, 2018. *Proceedings of AACR Annual Meeting 2019; March 29-April 3, Atlanta, GA, USA; 2019.*
  89. Zhang W, Liu HT. MAPK Signal Pathways in the Regulation of Cell Proliferation in Mammalian Cells. *Cell Res.* 2002 Mar;12(1):9-18.
  90. Zhou C, Qiu Zhong Q, Rhodes LV, Townley I, Bratton MR, Zhang Q, Martin EC, Elliott S, Collins-Burow BM, Matthew E Burow, Wang G. Proteomic Analysis of Acquired Tamoxifen Resistance in MCF-7 Cells Reveals Expression Signatures Associated With Enhanced Migration. *Breast Cancer Res.* 2012 Mar 14;14(2):R45.
  91. Zustiak S, Nossal R, Sackett DL. Multiwell Stiffness Assay for the Study of Cell Responsiveness to Cytotoxic Drugs. *Biotechnol Bioeng.* 2014 Feb;111(2):396-403.