

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.104>

<https://orcid.org/0000-0001-8541-8753>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

INGA
PEČIULIENĖ

Su onkologinėmis ligomis siejamas pre- iRNR splaisingas: splaisingo veiksmų ir hipoksinės mikroaplinkos tyrimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai
Biologija (N 010)

VILNIUS 2020

Disertacija rengta 2005 – 2011 metais Biotechnologijos institute. 2019 ginama ekspternu Vilniaus universitete.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – dr. Arvydas Kanopka (Vilniaus Universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Gynimo taryba:

Pirmininkas – prof. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Nariai:

Dr. Jurgita Matulienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Prof. dr. Kęstutis Sužiedėlis (Nacionalinis vėžio institutas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Prof. dr. Dalė Viežalienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, gamtos mokslai, biologija, N 010).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2020 m. lapkričio 27 d. 16 val. Vilniaus Gyvybės mokslų centro R-401 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva, tel. +37068193398; el paštas inga.peciuliene@bti.vu.lt

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

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.104>

<https://orcid.org/0000-0001-8541-8753>

VILNIUS UNIVERSITY

Inga
PEČIULIENĖ

Pre-mRNA Splicing Associated with Oncological Diseases: A Study of Splicing Factors and Hypoxic Microenvironment

DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2020

This dissertation was written between 2005 – 2011 at Institute of Biotechnology. The dissertation is defended on an external basis in 2019 at Vilnius University

The research was supported by Research Council of Lithuania

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant:

Dr. Arvydas Kanopka (Vilnius University, Nature sciences, Biology N 010).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

Chairman – Prof. Dr. Rolandas Meškys (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry N 004).

Members:

Dr. Jurgita Matulienė (Vilnius University, Nature sciences, Biochemistry N 004)

Dr. Aušra Sasnauskienė (Vilnius University, Nature sciences, Biology N 010)

Prof. Dr. Kęstutis Sužiedėlis (National Cancer Institute, Nature sciences, Biology N 010).

Prof. Dr. Dalė Vieželiienė (Lithuanian University of Health Science, Nature sciences, Biology N 010).

The dissertation shall be defended at a public/closed meeting of the Dissertation Defence Panel at 4 p.m. on 27th November 2020 in auditorium R-401 of the Life Science Center of Vilnius University. Adress: Saulėtekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania. Tel +37068193398, e-mail: inga.peciuliene@bti.vu.lt.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of (name of the institutions granted the right to conduct doctoral studies in alphabetical order), as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

TURINYS	5
SANTRUMPOS	8
ĮVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	16
1.1. iRNR brendimas eukariotuose: splaisingas	16
1.1.1. Pre-iRNR splaisingo mechanizmas	16
1.1.2. Alternatyviojo pre-iRNR splaisingo būdai	20
1.1.3. Alternatyvųjų pre-iRNR splaisingą reguliuojantys veiksniai	23
1.1.4. Ligas sukiantys pre-iRNR splaisingo pokyčiai	30
1.1.5. iRNR izoformų reikšmė patogenezei	33
1.2. Hipoksija	38
1.2.1. Hipoksijos indukuojami transkripcijos veiksniai (HIF)	39
1.2.2. Hipoksijos inicijuojami pre-iRNR splaisingo pokyčiai ir jų reikšmė ligų vystymosi procesuose	41
1.3. Pre-iRNR splaisingas: vėžio diagnostika ir gydymas	45
1.3.1. iRNR izoformų susidarymą organizme reguliuojantys cheminiai junginiai.....	45
1.3.2. Oligonukleotidų terapijos taikymas.....	46
1.3.3. Onkologiniai biožymenys: diagnostika ir prognozė.....	49
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI	50
2.1. Medžiagos	50
2.1.1. Reagentai	50
2.1.2. Tirpalai	51
2.1.3. Rinkiniai	52
2.1.4. Oligonukleotidai DNR amplifikacijai PGR ir qPGR metodais ir gRNR sintezei	53
2.1.5. Monokloniniai ir polikloniniai antikūnai	53

2.1.6.	Ląstelių linijos, mikroorganizmų kamienai ir plazmidinės DNR54	
2.1.7.	Virškinimo trakto organų augliai ir sveiki audiniai.....	55
2.1.8.	Molekulinės masės standartai.....	56
2.1.9.	Fermentai.....	56
2.1.10.	Bioinformatinės programos.....	56
2.2.	Tyrimo metodai.....	57
2.2.1.	DNR ir RNR tyrimo metodai.....	57
2.2.2.	Baltymų tyrimo metodai.....	62
2.2.3.	Eukariotinių ląstelių kultivavimas ir tyrimo metodai.....	63
3.	REZULTATAI.....	66
3.1.	Mokslinio darbo apibūdinimas.....	66
3.2.	Splaisingo veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos virškinimo trakto augliuose ir vėžinėse ląstelių linijose lyginamoji analizė.....	66
3.2.1.	Splaisingo veiksnių raiška navikiniuose gaubtinės žarnos, skrandžio ir kasos audiniuose.....	67
3.2.2.	Splaisingo veiksnių raiška virškinimo trakto ir inkstų ląstelių linijose.....	68
3.2.3.	Su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška navikiniuose gaubtinės žarnos, skrandžio ir kasos audiniuose.....	71
3.2.4.	Su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška virškinimo trakto ir inkstų ląstelių linijose.....	72
3.3.	Hipoksija keičia Fas pre-mRNA alternatyvųjį splaisingą.....	74
3.3.1.	Hipoksija HCT116 ląstelėse inicijuoja Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo pokyčius.....	75
3.3.2.	Hipoksija skirtingose ląstelių linijose keičia Fas pre-iRNR alternatyvųjį splaisingą.....	76
3.3.1.	Alternatyvios Rac1b iRNR izoformos susidarymas nuo hipoksijos nepriklauso.....	77
3.3.1.	Hipoksija įvairiose ląstelių linijose reguliuoja Fas baltymo kiekį..	79

3.3.2. Splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raiška nuo hipoksijos nepriklauso	80
3.3.1. Sumažėjusi splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raiška Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo nekeičia	82
4. DISKUSIJA.....	84
IŠVADOS.....	88
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	89
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION.....	103
SANTRAUKA	133
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	135
PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS	135
CURRICULUM VITAE	136
PADĖKA.....	138
UŽRAŠAMS	140

SANTRUMPOS

- 786-O – inkstų adenokarcinomos ląstelių linija;
A – šakojmosi taškas;
A549 – žmogaus alveolių bazinio epitelio adenokarcinomos ląstelių linija;
a.r. – aminorūgštis;
ARE – adenino ir uracilo nukleotidų pasikartojimų turinčios sekos (angl. *adenylate-uridylate-rich elements*);
ARNT – aromatinių angliavandenilių junginių receptoriaus branduolio translokacinis baltymas (angl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*);
APA – alternatyviojo poliadenilinimo seka;
AS – alternatyviai splaisinamas;
ASO – oligonukleotidai genų terapijai (angl. *antisense oligonucleotides*);
ATP – adenzin-5'-trifosfatas;
Bcl-X – išorinės mitochondrijų membranos baltymas;
bHLH – spiralė-kilpa-spiralė-motyvas;
BNIP3 – su BCL2/adenoviruso E1B 19 kDa baltymų sąveikaujantis baltymas 2;
bp – bazių pora;
CAIX – karboanhidrazė IX (angl. *carbonic anhydrase*);
Caki-1 – inkstų skaidriųjų ląstelių karcinomos ląstelių linija, kilusi iš metastazinių židinių odoje;
CASP – kaspazė;
cDNR – kopijinė DNR
Cyr61 – daug cisteino turintis angienezės aktyviklis (angl. *cysteine-rich angiogenic inducer 61*);
CLK – CLK/STY šeimos kinazės (angl. *cell division cycle (CDC) like kinases*);
COLO 205 – gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelių linija, kilusi iš pilvaplėvės ertmės skysčiuose esančių metastazinių židinių ląstelių;
circRNR – žiedinė viengrandė RNR molekulė;
C-TAD – transkripcijos aktyvacijos motyvas C-galinėje baltymo aminorūgščių sekoje;
Da – daltonas;
DD – žūties domenai;
DISC – ląstelės žūtį inicijuojantis kompleksas (angl. *Death-inducing signaling complex*);
DNR – deoksiribonukleorūgštis;
ESE – egzoninė splaisingą stimuliuojanti seka;

ESS – egzoninė splaisingą slopinanti seka;
Fas – navikų nekrozės veiksnio receptorių šeimai (TNFR) priklausantis ląstelės paviršiaus žūties receptorių.
FasL – Fas ligandas;
FFD – sąveikos su fosfataze domenas;
FIH-1 – dioksigenazių šeimos baltymas (angl. *factor inhibiting HIF*);
FL – viso ilgio;
GAP – GTP hidrolizuojantįjį domeną aktyvuojantys baltymai;
GEF – guanino pasikeitimo veiksniai (angl. *guanine nucleotide exchange factors*);
GDI – GDP disociaciją slopinantys baltymai (angl. *GDP dissociation inhibitor*);
GDP – guanozin-5'-difosfatas;
sgRNR – kreipiančioji RNR (angl. *single guide RNA*);
GTP – guanozin-5'-trifosfatas;
HCT116 – gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija;
HEK 293A – embrioninės inkstų ląstelių su įterptu 5 tipo adenoviruso genu linija;
Hela – žmogaus gimdos kaklelio karcinomos ląstelių linija;
HIF – hipoksijos indukuojami veiksniai (angl. *hypoxia inducible factors*);
HIF-1 – heterodimerinis baltymų kompleksas, sudarytas iš HIF-1 α ir HIF-1 β subvienetų;
HIF- α – hipoksijos indukuojamo veiksnio alfa subvienetas;
HIF- β – hipoksijos indukuojamo veiksnio beta subvienetas;
hnRNP – heterogeninės branduolio ribonukleobaltyminės dalelės (hnRNP A1, hnRNP AB, hnRNP I ir kt.);
HRE – atsako į hipoksiją sritis;
HuR – Hu antigenas R;
pVHL – *von Hippel-Lindau* baltymas;
iRNR – informacinė RNR;
ISE – introninė splaisingą stimuliuojanti seka;
ISS – introninė splaisingą slopinanti seka;
Y – pirimidino nukleotidas;
KATO III – skrandžio karcinomos ląstelių linija, kilusi iš metastazinių židinių limfmazgiuose;
KH – hnRNP K homologinis sąveikos su RNR domenas;
KHSRP – KH baltymų šeimai priklausantis splaisingo veiksnys;
miRNR – mikroRNR;
N-TAD – transkripcijos aktyvacijos motyvas N-galinėje baltymo aminorūgščių sekoje;

PANK-1 – žmogaus kasos lataų karcinomos ląstelių linija;
PGR – polimerazės grandininė reakcija;
PHD – prolilhidroksilazės;
Py – polipirimidininė seka;
pre-iRNR – informacinės ribonukleorūgšties (RNR) pirmtakė;
qRRM – kvazisąveikos su RNR domenais;
R – purino bazę turintis nukleotidas;
Rac1 – su Ras susijęs C3 botulino toksino substratas *I*;
Rac1b – 19 aminorūgščių liekanų intarpas turinti Rac1 baltymo izoforma;
RGG – iš arginino ir dviejų glicino aminorūgščių liekanų sekos sudarytas sąveikos su RNR domenais;
RISC – RNR indukuotas genų raišką slopinantis kompleksas (angl. *RNA-induced silencing complex*);
RNP – ribonukleobaltyminė dalelė;
RNR – ribonukleorūgštis;
RRM – RNR atpažinimo motyvas;
RRMH – RRM homologas;
RS – daug pasikartojančių arginino (R) ir serino (S) aminorūgščių liekanų turintis motyvas;
RT-PGR – atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija;
RT-qPGR – kiekybinė atvirkštinės transkripcijos polimerazės grandininė reakcija;
sFas – tirpi Fas baltymo izoforma;
snRNP – maža branduolio ribonukleobaltyminė dalelė (U1, U2 ir kt.);
snRNR – maža branduolio ribonukleorūgštis;
SPF45 – 45 kDa splaisingo veiksnys;
SR – RS domeną turintys baltymai (SRSF1, SRSF2 ir kt.)
SU.86.86 – žmogaus kasos lataų karcinomos ląstelių linija, kilusi iš metastazinių židinių kepenyse;
T3M4 – žmogaus kasos karcinomos ląstelių linija;
U2AF – U2 snRNP pagalbinis veiksnys;
U2AF65 – U2 snRNP pagalbinio veiksnio didysis (65 kDa) subvienetas;
U2AF35 – U2 snRNP pagalbinio veiksnio mažasis (35 kDa) subvienetas;
UHM – U2AF homologinis domenas;
UHL – U2AF ligando domenas;
UTR – netransliuojama sritis;
VEGFA – kraujagyslių endotelio augimo veiksnys.

ĮVADAS

Darbo aktualumas

Onkologinės ligos išlieka viena opiausių visuomenės problemų, nes sergamumas ir mirštamumas nuo jų nuolat didėja tiek Lietuvoje, tiek visame pasaulyje. Pastarojo dešimtmečio atradimai suteikė daug vertingos informacijos apie organizme vykstančius onkologinius procesus, tačiau akivaizdu, kad mūsų žinios šioje srityje vis dar nėra išsamios. Nors mokslo pažanga leido įdiegti įvairius vėžio profilaktikos bei diagnostikos metodus, vis dar negalime teigti, kad su onkologinėmis ligomis kovojama pakankamai efektyviai. Dėl to jaučiamas nuolatinis išsamių duomenų apie ląstelėje vykstančių svarbių biologinių procesų pokyčius poreikis. Pre-iRNR splaisingas yra labai svarbus genų raišką reguliuojantis procesas, tad nieko keista, kad splaisingo pokyčiai nustatyti daugelio įvairių ligų, ypač onkologinių, atvejais. Todėl su ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos ir ją reguliuojančių veiksnių tyrimai išlieka aktualūs, o atliktų tyrimų rezultatai papildė žinias apie įvairius ląstelėse vykstančius patologinius procesus.

Šiame moksliniame darbe aprašomas sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose bei iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose atliktas splaisingą reguliuojančių veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos tyrimas ir nagrinėjama, ar (kaip) hipoksinė mikroaplinka ląstelėse veikia su onkologinėmis ligomis siejamus pre-iRNR splaisingo pokyčius.

Vystant naujas onkologinių ligų gydymo strategijas, aktyviai tyrinėjami įvairūs antivėžiniai splaisingą slopinantys arba iRNR raiškos pakitimus sukeltantys junginiai. Pradiniame šių junginių tyrimų etape kaip naviko modelinė sistema dažniausiai naudojamos iš navikų išvestos ląstelių linijos. Tačiau sėkmingai ląstelių linijose atlikti naujų antivėžinių vaistų ir gydymo strategijų bandymai 3D ląstelių sistemose arba pradiniuose klinikinių tyrimų etapuose dažnai nepasitvirtina: pre-iRNR splaisingą ląstelėse veikiančius junginiai neveikia taip kaip modelinėse ląstelių linijų sistemose arba veikia labai neefektyviai. Deja, duomenų, leidžiančių tiksliai apibrėžti šių skirtumų priežastis, kol kas labai trūksta. Šiame moksliniame darbe atlikti tyrimai parodė navikiniuose audiniuose ir dažniausiai naudojamose ląstelių linijose egzistuojančius splaisingo veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos skirtumus. Gauti rezultatai suteikia vertingos informacijos apie skirtingose sistemose vykstančius ligas inicijuojančius biologinius procesus.

Nors nuodugni navikų ląstelių genomų analizė leido pasiekti didžiulę pažangą antivėžinių terapijų kūrimo srityje, navikinių ląstelių atsparumas taikomam gydymui išlieka pagrindinė mirties nuo vėžio priežastis. Akivaizdu, kad navikų ląstelėse vykstantys patologiniai procesai priklauso ne tik nuo genetinių veiksnių, bet ir nuo ląstelių mikroaplinkos poveikio. Hipoksija yra vienas iš pagrindinių naviko ląstelių mikroaplinkos komponentų. Sumažėjęs deguonies kiekis ląstelių aplinkoje siejamas ne tik su onkologinių, bet ir su įvairių kitų ligų, pavyzdžiui, infarkto, periferinių ir vainikinių arterijų ligų, anemijos, plaučių arterijos hipertenzijos, eritrocitozės, Alzheimerio, Parkinsono, Huntingtono ligų, atsiradimu ir vystymusi. Žinoma, kad hipoksinė mikroaplinka ląstelėse lemia pre-iRNR splaisingo pokyčius, tačiau šio proceso mechanizmas ir jį reguliuojantys veiksniai nėra žinomi. Dėl šios priežasties nuo hipoksijos priklausomo pre-iRNR splaisingo ir jį reguliuojančių veiksnių tyrimai išlieka labai aktualūs siekiant kontroliuoti su ligomis siejamų iRNR susidarymo procesus.

Darbo tikslai:

1. Sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose ištirti splaisingo veiksnių bei su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raišką ir palyginti su šių veiksnių bei iRNR izoformų raiška iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose.
2. Nustatyti, kaip ląstelių aplinkoje sumažėjęs deguonies kiekis (hipoksija) veikia su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raišką, ir ištirti, ar žinomi splaisingo veiksniai hipoksinėse ląstelėse reguliuoja šių iRNR izoformų susidarymą.

Darbo uždaviniai:

1. Palyginti splaisingą reguliuojančių veiksnių U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP raišką sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose.
2. Palyginti su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų susidarymo profilius sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose.

3. Palyginti splaisingą reguliuojančių veiksnių U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP raišką iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose su veiksnių raiška HEK 293A ląstelėse.
4. Nustatyti su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų susidarymo profilius iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ir HEK 293A ląstelių linijose.
5. Išsiaiškinti, ar ląstelių linijose hipoksinės aplinkos sąlygos daro įtaką su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų susidarymui.
6. Nustatyti, ar (kaip) hipoksinė mikroaplinka ląstelių linijose keičia splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raišką.
7. Nustatyti, ar splaisingo veiksniai SPF45 ir hnRNP A1 hipoksinėse ląstelėse reguliuoja Fas geno iRNR izoformų susidarymą.

Darbo mokslinis naujumas ir praktinė vertė

Disertaciniame darbe nagrinėjamos su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos pokyčių priežastys ir tiriama šiuos pokyčius sukeliantys genetiniai bei išoriniai (mikroaplinkos) veiksniai.

Darbe nuodugniai ištirta su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 genų iRNR susidarymo ir splaisingą reguliuojančių veiksnių U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP raiška virškinimo trakto organų sveikuose ir navikiniuose audiniuose bei iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose. Duomenų apie tokio tipo navikų ir iš jų išvestų ląstelių linijų tyrimus literatūroje yra labai nedaug. Šiame darbe nustatyti skirtingi splaisingo veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos profiliai parodė, kad iš navikų išvestos ląstelių linijos skiriasi tiek nuo sveikų, tiek nuo navikinių audinių. Šie rezultatai patvirtina, kad ląstelių linijos, kaip modelinė sistema, ne iki galo atspindi visus navikinėse ląstelėse vykstančius biologinius procesus. Gauti nauji duomenys leidžia paaiškinti, kodėl sėkmingai ląstelių linijose atlikti antivėžinių vaistų ar gydymo strategijų bandymai pradinuose klinikinių tyrimų etapuose dažnai nepasitvirtina. Tyrimo metu skirtinguose auglių tipuose identifiukuota jiems būdinga skirtingų splaisingo veiksnių raiška, todėl veiksniai U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP gali būti panaudoti kaip potencialūs žymenys navikų diferencinei diagnostikai.

Moksliniame darbe apibūdinti nuo sumažėjusio deguonies kiekio aplinkoje (hipoksijos) priklausomos iRNR raiškos ir ši procesą reguliuojančių veiksnių tyrimai. Parodyta, kad hipoksinė mikroaplinka iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose keičia Fas iRNR izoformų raišką, tačiau Rac1 iRNR izoformų raiška nuo hipoksijos nepriklauso. Iki šiol tokių duomenų literatūroje nebuvo. Taip pat darbe parodyta, kad splaisingo veiksniai SPF45 ir hnRNP A1 hipoksinėmis aplinkos sąlygomis Fas geno iRNR izoformų susidarymo nereguliuoja. Šie rezultatai suteikia naujų žinių apie tai, kokią įtaką ląstelių hipoksinė mikroaplinka daro su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR raiškai. Pasinaudojant šiais duomenimis ir tinkamai įvertinus hipoksinės mikroaplinkos poveikį, ląstelių modelinėse sistemose bus galima sukurti auglių mikoraplinską maksimaliai atitinkančias sąlygas. Tik tinkamai parinkta pradinių tyrimų modelinė sistema yra sėkmingų naujų antivėžinių terapijų pagrindas. Taip pat gauti rezultatai yra labai vertingi siekiant kontroliuoti su ligomis siejamų iRNR susidarymo procesus ir taip užkirsti kelią įvairiems patologiniams procesams.

Ginamieji teiginiai

1. Splaisingo veiksnių SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 ir KHSRP raiška kasos, gaubtinės žarnos ir skrandžio navikuose kinta nevienodai.
2. Tirtuose navikuose lyginti su sveikais audiniais, antiapoptozinių sFas ir Rac1b iRNR izoformų raiška didėja.
3. Splaisingo veiksnių SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 ir KHSRP raiška visose tirtose iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose, palygint su jų raiška HEK 293A ląstelių linijoje, kinta.
4. Su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose neatitinka navikuose nustatyto šių iRNR izoformų raiškos profilio.

5. Deguonies kiekio aplinkoje pokyčiai iš virškinamo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose lemia Fas iRNR izoformų raišką, tačiau Rac1 iRNR izoformų raiška nuo deguonies kiekio aplinkoje nepriklauso.

6. Splaisingo veiksmų SPF45 ir hnRNP A1 raiška tirtose ląstelių linijose nuo deguonies koncentracijos pokyčių aplinkoje nepriklauso.

7. Sumažėjus deguonies kiekiui aplinkoje pasikeitusios Fas geno iRNR izoformų raiškos splaisingo veiksniai SPF45 ir hnRNP A1 neveikia.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. iRNR brendimas eukariotuose: splaisingas

Eukariotų genai sudaryti iš koduojančių (egzoninių) ir jų nekoduojančių (introninių) sekų. Eukariotinių ląstelių branduoliuose susidarę nesubrendę iRNR transkriptai (pre-iRNR) yra modifikuojami: vykdomas „kepurės“ uždėjimas, pre-iRNR splaisingas ir 3' iRNR galinės dalies poliadenilinimas. „Kepurės“ uždėjimas – tai procesas, kurio metu prie 5' pre-iRNR grandinės galo prijungiamas 7-metilganozin-5'-trifosfatas. Poliadenilinimu vadinamas 100–200 adenino bazių prijungimas prie iRNR 3' grandinės sekos.

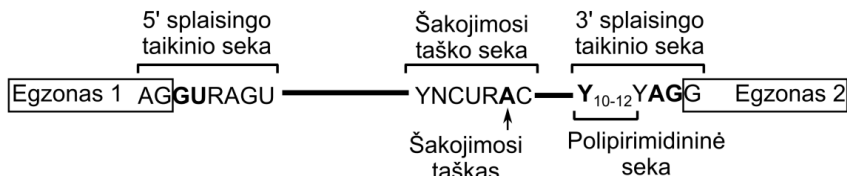
Ląstelės branduolyje vykstantis procesas, kurio metu iš pre-iRNR sekos pašalinami intronai, o egzonai sujungiami, vadinamas splaisingu (Black, 2000). Eukariotiniuose organizmuose vyksta savaiminis ir reguliuojamas pre-iRNR splaisingas. Savaiminis pre-iRNR splaisingo procesas vyksta archėjose, eubakterijose, žemesniųjų eukariotų branduoliuose ir žemesniųjų bei aukštesniųjų eukariotų organelėse (mitochondrijose, chloroplastuose). Savaiminio splaisingo procesą aktyvina pačios RNR molekulės (Saldanha, Mohr et al., 1993). Reguliuojamas splaisingas vyksta aukštesniųjų eukariotų branduoliuose. Jį vykdo ir reguliuoja ribonukleobaltyminis kompleksas – splaisosoma (Will ir Luhrmann, 2011). Skiriami du reguliuojamo splaisingo tipai: alternatyvusis ir konstitutyvusis splaisingas. Vykstant konstitutyviajam splaisingui, visi geną sudarantys egzonai jungiami į iRNR seką. Alternatyviojo splaisingo metu nuo tos pačios pre-iRNR susidaro skirtingos iRNR izoformos (Zheng, Fu et al., 2005).

1.1.1. Pre-iRNR splaisingo mechanizmas

Intronų šalinimas iš susintetintos naujos pre-iRNR molekulės yra sudėtingas ir griežtai reguliuojamas procesas, kurį vykdo splaisosoma. Tai eukariotinių ląstelių branduoliuose esantis dinamiškas baltymų ir mažųjų branduolio RNR (angl. *small nuclear RNA*, snRNA) kompleksas (Will ir Luhrmann, 2011). Eukariotuose identifikuotos dviejų tipų – U2 ir U12 – splaisosomos (Basu, Makalowski et al., 2008).

1.1.1.1. Kanoninės pre-iRNR sekos

Kanoninės pre-iRNR sekos – tai egzono ir introno sandūroje esančios 5' ir 3' splaisingo taikinių sekos bei intronuose nustatyta šakojimosi taško ir polipirimidininė seka (1 pav.) (Yoshimi ir Abdel-Wahab, 2017).



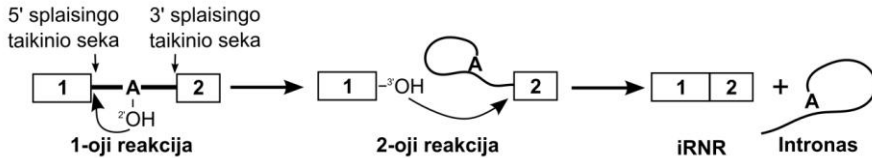
1 pav. Aukštesniųjų eukariotų U2 tipo intronų kanoninės pre-iRNR sekos. 5' ir 3' splaisingo taikinių sekos, šakojimosi taško seka ir šakojimosi taškas, polipirimidininė seka. Čia R – purino nukleotidas, Y – pirimidino nukleotidas, N – bet koks nukleotidas; konservatyvūs nukleotidai paryškinti (A – adeninas, G – guaninas, U – uracilas) (Yoshimi ir Abdel-Wahab, 2017)

Aukštesniuosiuose eukariotuose introno pradžia ir pabaigą žymi kanoninėse sekose esantys GU ir AG nukleotidai, kurie būdingi didžiajai daliai visų eukariotuose nustatytų intronų. Šiuos intronus iš pre-iRNR sekos šalina pagrindinė vadinamoji U2 splaisosoma. Intronuose prieš 3' splaisingo taikinio seką esantis šakojimosi taškas nuo jos nutolęs per 15–45 nukleotidų. Aukštesniuosiuose eukariotuose šakojimosi taškas dažniausiai būna adenino nukleotidas (Touchman, D'Souza et al., 1995). Intronuose tarp 3' splaisingo taikinio ir šakojimosi taško sekų nustatyta skirtingo ilgio pirimidino nukleotidų uracilo (U) ir (ar) citozino (C) sritis, vadinama polipirimidinine seka. Polipirimidininės sekos skirstomos į stiprias, turinčias ilgą ir nepertraukiamą U/C seką ir silpnas, kurioms būdingos įsiterpusių purino nukleotidų pertrauktos trumpos U/C nukleotidų sekos. Polipirimidininė seka sustiprina 3' splaisingo taikinio sekos atpažinimą (Mullen, Smith et al., 1991).

1.1.1.2. U2 splaisosoma

U2 splaisosoma, dar vadinama pagrindine splaisosoma, eukariotuose katalizuoja ~99 % žmogaus introninių sekų pašalinimą (Will ir Luhrmann, 2011). Ją sudaro penkios mažos branduolio ribonukleobaltyminės dalelės (angl. *small nuclear ribonucleoprotein particles*, snRNP) U1, U2, U5 ir U4/U6. Kiekvieną jų sudaro unikalios ~150 nukleotidų ilgio mažosios branduolio RNR (angl. *small nuclear RNR*, snRNR), septyni bendri snRNP

šerdį formuojantys baltymai (SmB/SmB', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF ir SmG) ir keletas papildomų kiekvienai ribonukleobaltyminei dalelei būdingų baltymų (Azubel, Wolf et al., 2004). Cheminiu požiūriu pre-iRNR splaisingas yra dviejų pakopų transesterifikacijos reakcija, kurią katalizuoja splaisosoma (2 pav.).



2 pav. Pre-iRNR splaisingo mechanizmas – dviejų pakopų transesterifikacijos reakcija. Linija žymi intronines sekas, langeliai žymi egzonines sekas, rodyklėmis pažymėtos reakcijoje dalyvaujančios funkcinės grupės; A – šakojimosi taškas (Horowitz, 2012)

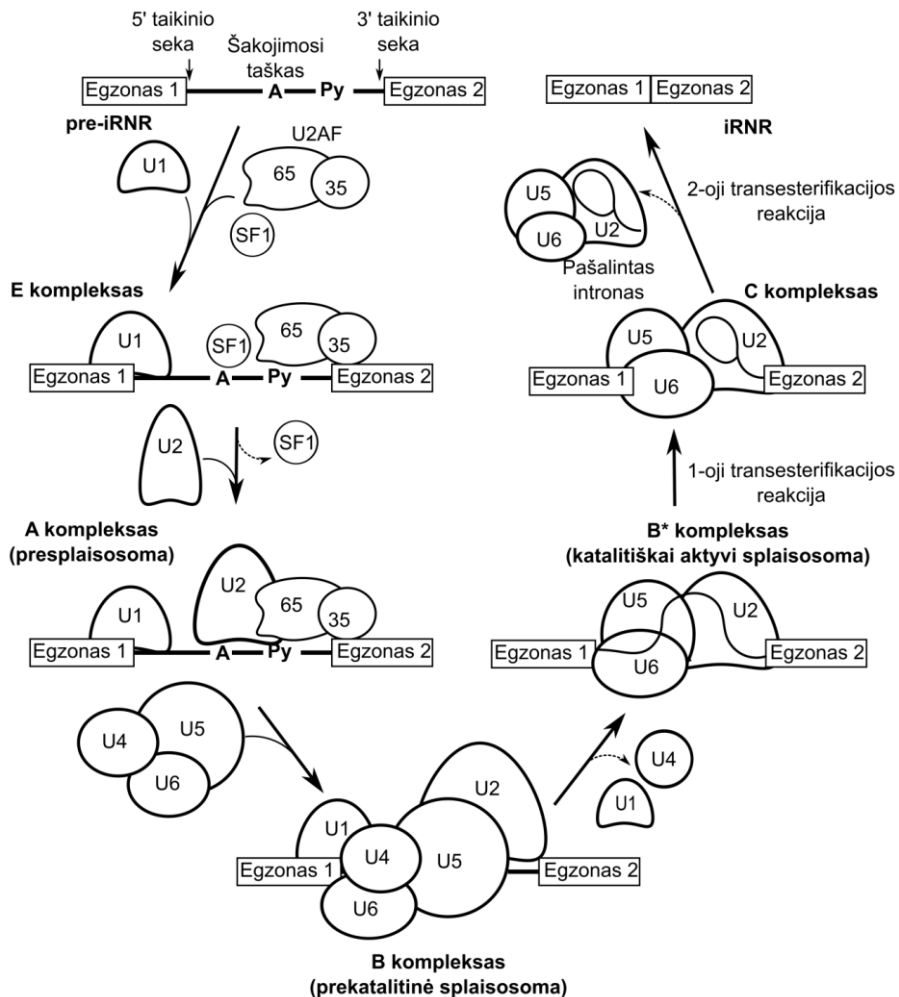
Splaisosomos formavimasis yra dinamiškas etapais vykstantis procesas (3 pav.). Splaisosomos susirinkimas prasideda tada, kai su pre-iRNR 5' egzonine seka sąveikaujantys SR baltymai prie 5' splaisingo taikinio sekos pritraukia U1 snRNP dalelę. U1 snRNP dalelė jungiasi prie 5' splaisingo taikinio sekos. Prie šakojimosi taško sekos jungiasi splaisingo veiksnys SF1 (angl. *splicing factor 1*), o U2 pagalbinio heterodimerinio veiksnio (angl. *U2 auxiliary factor*, U2AF) 65 ir 35 kDa subvienetai U2AF65 ir U2AF35 sąveikauja su atitinkama polipirimidinine seka (Py) ir 3' splaisingo taikinio sekos AG nukleotidais. Susidaro nuo ATP hidrolizės nepriklausomas vadinamasis ankstyvasis, arba E (angl. *early*), splaisosomos kompleksas (Das, Zhou et al., 2000).

E komplekso komponentai U2AF65 ir SF1 prie pre-iRNR pritraukia U2 snRNP dalelę, kuri sąveikauja su šakojimosi taško seka. Šiai sąveikai reikalinga energija gaunama vykstant ATP hidrolizei. Splaisingo veiksnys SF1 disocijuoja – susidaro A splaisosomos kompleksas, dar vadinamas presplaisosoma (Shao, Kim et al., 2012). Prie A splaisosomos komplekso prisijungus trinariam U5/U4/U6 kompleksui, susidaro prekatalitinis B splaisosomos kompleksas. Formuojantis šiam kompleksui vyksta splaisosomos konformaciniai persitvarkymai. Jie suartina 5' ir 3' splaisingo taikinių sekas (Boesler, Rigo et al., 2016).

Toliau vykstant RNR-RNR ir RNR-baltymų sąveikų struktūriniais pokyčiams, suardomi U4/U6 snRNP komplekso vandeniliniai ryšiai. U1 ir U4 snRNP dalelės disocijuoja, U6 snRNP dalelė sąveikauja su 5' splaisingo taikinio sekomis bei U2 snRNP dalele, o U5 snRNP sąveikauja su pre-iRNR 5' ir 3' splaisingo taikinių sekomis. Susidaro katalitiškai aktyvi splaisosoma (B* kompleksas). Katalitiniame splaisosomos centre inicijuojama pirmoji

pre-iRNR transesterifikacijos reakcija: susidaro atskeltas pirmasis 5' egzonas bei antrasis 3' egzonas su prijungta kilpos formos intronine seka (Bessonov, Anokhina et al., 2010).

Įvykus splaisosomos konformaciniam persitvarkymams, susidaro C splaisosomos kompleksas. Šis katalizuoja antrąją pre-iRNR transesterifikacijos reakciją. Jos metu gaunama sujungta iRNR ir su snRNP U2, U5 ir U6 susijungęs kilpos formos intronas. Splaisosomos komponentai disocijuoja ir toliau dalyvauja naujos splaisosomos susidarymo procese (Papasaikas ir Valcarcel, 2016).



3 pav. U2 tipo splaisosomos formavimosi etapai (Yoshimi ir Abdel-Wahab, 2017). U1, U2, U4, U5, U6 – mažosios branduolio snRNP; SF1 – splaisingo veiksnys 1; U2AF (65 / 35) – U2 pagalbinio veiksnio U2AF subvienetai U2AF65 ir U2AF35; punktyrinės rodyklės žymi disociaciją; Py – polipirimidininė seka; paryškinta linija – intronas (Yoshimi ir Abdel-Wahab, 2017)

1.1.1.3.U12 intronai ir jų splaisingą vykdanči U12 splaisosoma

Eukariotuose, be pagrindinės U2 splaisosomos, nustatyta dar viena vadinamoji U12 splaisosoma. Ši splaisosoma iš pre-iRNR sekos iškerpa U12 tipo intronus. U12 intronai – tai savita eukariotų intronų grupė, kuri vietoj introną ribojančių GU ir AG nukleotidų dažniausiai turi AU ir UC nukleotidus. Eukariotiniuose organizmuose U12 tipo intronai sudaro mažiau nei 0,5 % visų intronų. Jie dažniausiai nustatomi genuose, kurių koduojami baltymai dalyvauja DNR replikacijos, pažaidų taisymo, transkripcijos, translacijos, ląstelės skeleto organizacijos, vezikulių pernašos, jonų kanalų aktyvumo reguliacijos ir kituose svarbiuose procesuose (Burge, Padgett et al., 1998). Nustatyta, kad U12 tipo intronų splaisingas yra lėtesnis už U2 tipo intronų šalinimo procesą (Turunen, Niemela et al., 2013).

U12 intronams būdingos konservatyvios 5' splaisingo taikinio bei šakojimosi taško srities sekos. Savo struktūroje U12 intronai neturi polipirimidinės sekos, įprastai esančios U2 intronuose netoli 3' splaisingo taikinio sekos (Brock, Dietrich et al., 2008). U12 splaisosomą sudaro unikalios U11, U12, U4atac ir U6atac snRNP dalelės. U4atac ir U6atac sudėtyje nustatytos tik šioms dalelėms būdingos mažosios branduolio RNR. U11 ir U12 snRNP sudėtyje esantys septyni baltymai taip pat yra būdingi tik U12 splaisosomai. U5 snRNP bei kiti splaisosomą sudarantys baltymai yra bendri abiejų tipų splaisosomoms (Verma, Akinyi et al., 2018).

1.1.2. Alternatyviojo pre-iRNR splaisingo būdai

Pre-iRNR brendimo metu nuo vieno geno susintetinama net keliolika skirtingų iRNR izoformų. Puikus to pavyzdys yra drozofilos DSCAM (angl. *Drosophila Down syndrome cell adhesion molecule*) genas – vykstant DSCAM pre-iRNR brendimui gali susidaryti net 38 016 skirtingų iRNR izoformų, kai pačios drozofilos genomą sudaro ~14 500 genų (Schmucker, Clemens et al., 2000). Nustatyta, kad 92–94 % žmogaus genų yra alternatyviai splaisinami, todėl šis procesas yra labai svarbus genų raiškos reguliavimo etapas (Pan, Shai et al., 2008, Wang, Sandberg et al., 2008). Alternatyviojo splaisingo metu nuo tos pačios pre-iRNR susidaro skirtingą nukleotidų seką turinčios alternatyvios iRNR izoformos, o tai lemia nuo šių iRNR sintetintų baltymų funkcijas, aktyvumą, sąveikas, stabilumą ir kt. (Nilsen ir Graveley, 2010).

Splaisingo metu, alternatyviai jungiant vieną iš dviejų galimų 5' ir 3' splaisingo taikinio sekų, praleidžiant ar įterpiant egzonines ar intronines

sekas, ląstelėje susidaro skirtingos iRNR izoformos. Žinoma įvairių alternatyviojo pre-iRNR splaisingo būdų (4 pav.) (Matlin, Clark et al., 2005, Wang, Sandberg et al., 2008, Guo, Agarwal et al., 2014, Ivanov, Memczak et al., 2015).

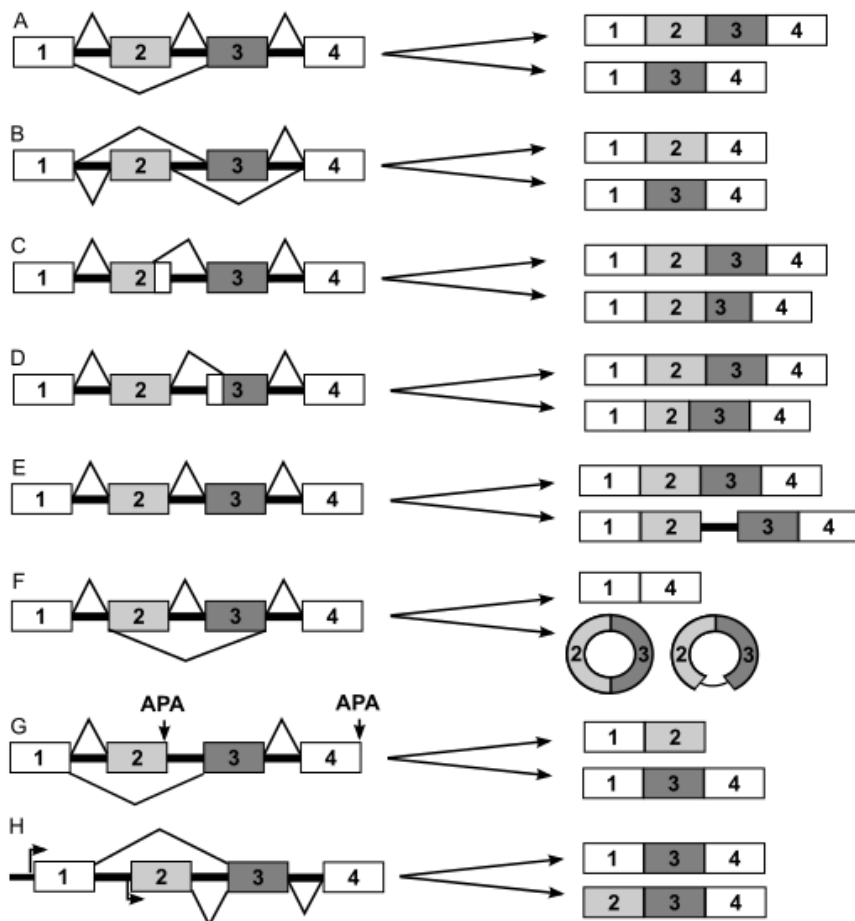
Dažniausiai pasitaikantis alternatyviojo splaisingo variantas yra egzono įterpimas arba praleidimas. Šiuo būdu tarpusavyje sujungiama daugiau nei 40 % visų egzonų (Sugnet, Kent et al., 2004). Vienas iš šio alternatyviojo splaisingo varianto pavyzdžių yra indukuotų mieloidinių ląstelių leukemijos diferenciacijos baltymo Mcl-1, dalyvaujančio apoptozės reguliacijoje, pre-iRNR alternatyvusis splaisingas. Nustatyta, kad nuo viso ilgio Mcl-1 iRNR sintetinas baltymas didina ląstelės atsparumą apoptozei. Alternatyviojo splaisingo metu 2 egzonas praleidžiamas, o nuo susidariusios iRNR izoformos sintetinas baltymas skatina ląstelėje vykstančius apoptozinius procesus (Bingle, Craig et al., 2000).

Dar vienu atveju alternatyvusis splaisingas vyksta egzonus jungiant pasirinkus vieną iš dviejų – 3' ar 5' – taikinio sekų. Šiuo atveju pasikeitęs atvirojo skaitymo rėmelis lemia skirtingų baltymo izoformų raišką (Koren, Lev-Maor et al., 2007). Puikus to pavyzdys yra baltymo adapterio 7 (angl. *docking protein 7*, Dok7) pre-iRNR alternatyvusis splaisingas, kurio metu skirtingai naudojama viena iš dviejų alternatyvių 4 egzono 5' splaisingo taikinio sekų. Nuo susidariusių iRNR izoformų sintetinami skirtingomis funkcijomis pasižymintys baltymai: neuronų ir raumens ląstelių jungčiai susidaryti reikalingas viso ilgio Dok7 baltymas bei trumpesnė Dok7 baltymo izoforma. Trumpesnysis Dok7 baltymas negali dalyvauti neuroraumeninės sinapsės formavimo procese, dėl to nervinio signalo perdavimas raumenų ląstelėms nevyksta (Ahsan, Masuda et al., 2017).

Ne visada vykstant alternatyviajam splaisingui iš pre-iRNR sekos šalinamos visos introninės sekos. Kai kuriais atvejais intronas paliekamas. Šis alternatyviojo splaisingo variantas vadinamas introno įterpimu. Intronų sekose dažnai pasitaikantys STOP kodonai lemia pakitusių iRNR susidarymą. Dažniausiai nuo šių iRNR vykdoma beprasmės (angl. *non-sense*) iRNR sintezė arba sintetinami pakitusio funkcinio aktyvumo baltymai (Jacob ir Smith, 2017, Vanichkina, Schmitz et al., 2018). Beprasmės iRNR susidarymas yra vienas iš ląstelėse taikomų baltymų raiškos reguliavimo būdų (Wong, Ritchie et al., 2013).

Grįžtamasis splaisingas – tai alternatyviojo splaisingo būdas, kai į besiformuojančią iRNR neįjungtos RNR transkripto sekos sudaro žiedines viengrandes RNR molekules (angl. *circular RNAs*, circRNR) (Nigro, Cho et al., 1991). Iki šiol įvairiuose organizmuose (pvz., vaisinė muselė, kirmėlės, pelė, žmogus) nustatyta daugiau nei 10 000 skirtingų circRNR (Guo,

Agarwal et al., 2014, Ivanov, Memczak et al., 2015). Padidėjusi circRNR sintezė yra būdinga tam tikriems audinių ar ląstelių (pavyzdžiui, neuronų) tipams (Liang ir Wilusz, 2014). Viena circRNR funkcijos teorijų teigia, kad circRNR ląstelės citoplazmoje sąveikauja su miRNR ir taip reguliuoja atitinkamų genų raišką. Tokios reguliacijos pavyzdys yra miR-7 circRNR (ciRS-7) susidarymas. Ląstelėse susidariusi miR-7 įjungama į RNR indukuoto genų raiškos slopinimo kompleksą RISC (angl. *RNA-induced silencing complex*) sudėtį. MiR-7/RISC kompleksas, sąveikaudamas su miR-7 komplementarių sekų turinčiomis iRNR, lemia jų degradaciją. Kai miR-7 sąveikauja su circRNR, miR-7/RISC kompleksas nesusidaro ir genų raiška neslopinama (Hansen, Jensen et al., 2013, Lukiw, 2013).



4 pav. Alternatyviojo pre-iRNR splaisingo būdai: *A* – egzono įterpimas arba praleidimas; *B* – vieno iš dviejų egzonų įjungimas; *C* – alternatyvios 3' taikinio sekos panaudojimas; *D* – alternatyvios 5' taikinio sekos pasirinkimas; *E* – introno sekos įjungimas; *F* – žiedinės iRNR susidarymas; *G* – alternatyviojo poliadenilimo (APA) sekų panaudojimas; *H* – alternatyviojo promotoriaus pasirinkimas (Nigro, Cho et al., 1991, Beqqali, 2018)

Vienos iš kelių galimų alternatyvių promotorinių sekų pasirinkimas – tai dar vienas iRNR izoformų susidarymo būdas. Taip susidaro skirtingas 5' netransliuojamas sritis (5'-UTR) ar skirtingą pirmojo egzono seką turinčios iRNR izoformos. 53 % žmogaus genų nustatyti alternatyvūs promotoriai atlieka genų raiškos reguliacijos funkcijas (Kamat, Hinshelwood et al., 2002). Alternatyvių promotorių pasirinkimą lemia pačių promotorių sekos bei struktūra. Taip yra todėl, kad splaisingas vyksta kotranskripciškai, t. y. transkripcijos ir splaisingo procesai vyksta tuo pačiu metu. Nustatyta, kad šalia promotoriaus prisijungę transkripcijos veiksniai nulemia RNR polimerazės elongacijos greitį. Jie taip pat lemia su RNR polimerazės II C-galiniu domenu (angl. *carboxy terminal domain*, CTD) sąveikaujančių splaisingo veiksmų išsidėstymą ant pre-iRNR. Dėl šių priežasčių skirtingo promotoriaus pasirinkimas lemia skirtingų iRNR susidarymą nuo tos pačios pre-iRNR (D'Alessio, Wright et al., 2009).

Alternatyviosios poliadenilimo sekos (APA) naudojamos visuose eukariotiniuose organizmuose. Taip susidaro skirtingas 3' galines sekas turinčios iRNR izoformos. Pagal vietą pre-iRNR sekoje APA skirstomos į egzonų (intronų) sekose ir 3' netransliuojamoje pre-iRNR srityje (3'-UTR) esančias APA sekas. Dažniausiai vienos ar kitos APA sekos panaudojimą lemia pre-iRNR splaisingo pokyčiai, dėl to susidaro skirtingą 3' galinę sritį turinčios iRNR izoformos. RNR sekoje atsiradusios mutacijos, kurios lemia pakitusių iRNR izoformų susidarymą, keičia ir APA sekų panaudojimą. Nustatyta, kad nuo 3'UTR ilgio priklauso iRNR transkripto stabilumas ar transliacijos efektyvumas. Dėl to APA pasirinkimas ląstelėse dažnai taikomas kaip centralizuotas genų raiškos reguliacijos mechanizmas (Chen, Jia et al., 2017).

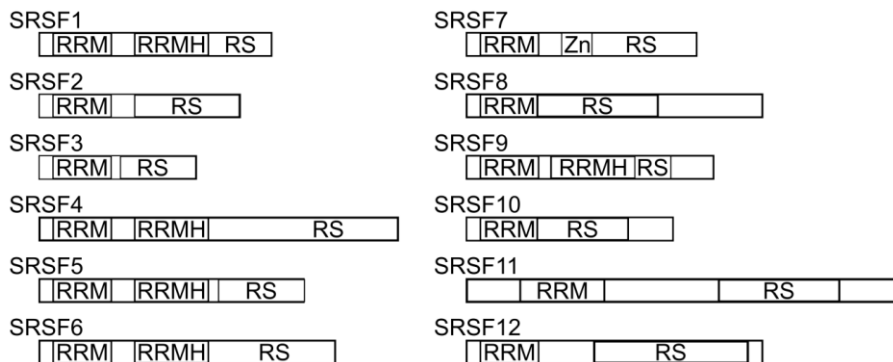
1.1.3. Alternatyvų pre-iRNR splaisingą reguliuojantys veiksniai

Alternatyviųjų splaisingo taikinių sekų panaudojimą lemia pavienės arba klasteriais išsidėsčiusios trumpos (apytiksliai 10 nukleotidų) egzonuose / intronuose esančios splaisingo reguliacinės sekos. Jos skirstomos į egzonines / intronines splaisingą stimuliuojančias (angl. *exonic / intronic splicing enhancers*, ESE / ISE) ir egzonines / intronines splaisingą slopinančias (angl. *exonic / intronic splicing silencers*, ESS / ISS) sekas. Su šiomis sekomis sąveikaujantys baltymai vadinami *trans* splaisingo veiksniais. Vieni svarbiausių *trans* splaisingo veiksmų yra SR baltymai (angl. *serine / arginine rich proteins*) ir heterogeninės branduolio

ribonukleobaltyminės hnRNP dalelės (angl. *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) (Dreyfuss, Matunis et al., 1993, Graveley, 2000).

1.1.3.1. SR šeimos baltymų splaisingo veiksniai

SR baltymų šeima yra visuose aukštesniuose eukariotuose esanti *trans* splaisingo veiksnių grupė (5 pav.). Šių baltymų C-galinėje dalyje nustatytas iš serino ir arginino aminorūgščių liekanų pasikartojančios sekos sudarytas RS domenas dalyvauja SR baltymams formuojant baltymo-baltymo sąveiką. N-galinėje dalyje SR baltymai turi RNR atpažinimo domeną (angl. *RNA recognition motif*, RRM).

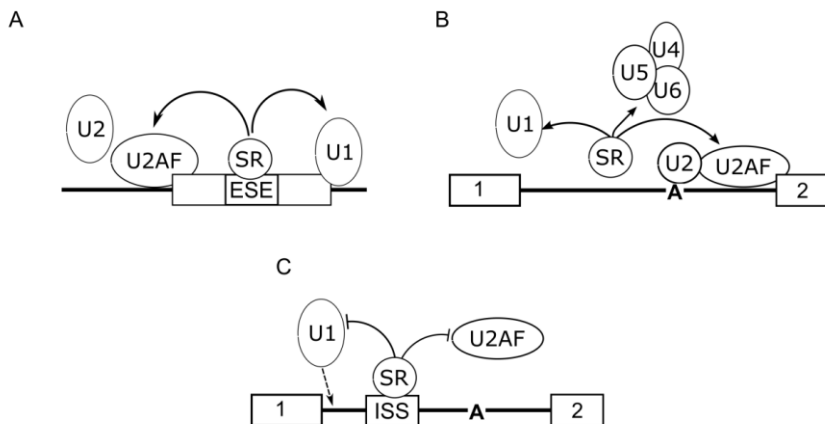


5 pav. SR šeimos baltymų struktūra. Čia RRM – sąveikos su RNR domenas, RS – iš arginino ir serino aminorūgščių liekanų pasikartojančios sekos sudarytas domenas, Zn – cinko pirštelių motyvas (Jeong, 2017)

Kai kurie SR baltymai N-galinėje dalyje taip pat turi papildomą į RRM panašų RNR atpažinimo domeną, vadinamą RRM homologiniu (angl. *RRM homology motif*, RRMH) domenu (Shepard ir Hertel, 2009). RRM ir RRMH domenai reikalingi SR baltymų ir RNR sąveikai. Žmogaus organizme nustatyta 12 struktūriškai panašių SR baltymų, dar vadinamų SR splaisingo veiksniais (SRSF1-12) (Manley ir Krainer, 2010).

SR baltymai yra svarbūs alternatyviojo ir konstitutyviojo splaisingo reguliatoriai (6 pav.). Prie ESE sekų prisijungę SR baltymai, sudarydami baltymo-baltymo sąveikas, prie 5' splaisingo taikinio sekų pritraukia U1 snRNP dalelę ir stabilizuoja U2AF veiksnio sąveiką su polipirimidinine bei 3' splaisingo taikinio seka. SR baltymų sąveika su ESE sekomis skatina prieš egzoną esančios introninės sekos pašalinimą (Long ir Cáceres, 2009). Sąveikaudami su trinariu U5/U4/U6 snRNP kompleksu, SR baltymai

stabilizuoja šio komplekso ir pre-iRNR sąveiką ir palengvina splaisosomos persigrupavimą. Minėtais atvejais SR baltymai veikia kaip teigiami splaisingo reguliatoriai. Tačiau SR baltymams būdingas ir splaisingą neigiamai reguliuojantis veikimas. Prie ISS sekų prisijungę SR baltymai blokuoja splaisosomos komponentų prisijungimą ir taip slopina atitinkamų splaisingo taikinių panaudojimą (Shepard ir Hertel, 2009).



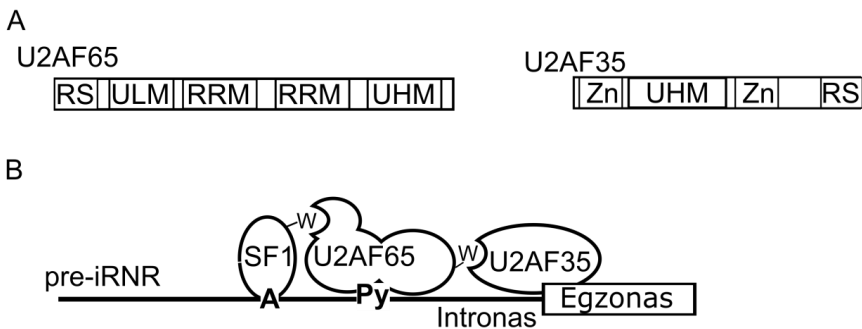
6 pav. SR baltymų alternatyviojo splaisingo reguliacijos mechanizmai. A – prie ESE prisijungę SR baltymai skatina splaisosomos komplekso komponentų pritraukimą prie atitinkamų splaisingo taikinių sekų; B – SR baltymai reguliuoja U4/U6/U5 snRNP trinario komplekso pritraukimą prie pre-iRNR; C – SR baltymai, sąveikaudami su introninėmis ISS sekomis, slopina alternatyvųjį splaisingą. Čia U1, U2, U4, U5, U6 – mažosios branduolio snRNP; SR ir U2AF – SR šeimos baltymai; langeliai žymi egzonus, linija – intronus, rodyklės – SR baltymų aktyvuojamą veikimą, brūkšniai – SR baltymų sąveiką slopinantį veikimą (Long ir Caceres, 2009)

SR šeimos baltymai dalyvauja ir kituose ląstelėse vykstančiuose procesuose. Tarp branduolio ir citoplazmos migruojantys splaisingo veiksniai SRSF1, SRSF3 ir SRSF7 dalyvauja iRNR pernešimo į citoplazmą procesuose. Šie splaisingo veiksniai taip pat dalyvauja translacijos reguliacijos procesuose. Splaisingo veiksniai SRSF1, SRSF2, SRSF5 bei SRSF6 yra reikalingi vykstant beprasmės iRNR degradacijai (Long ir Caceres, 2009). SR baltymų aktyvumas priklauso ir nuo RS motyve esančių serino aminorūgščių liekanų fosforilinimo lygio, kuris keičia SR baltymų sudaromas baltymo-baltymo, baltymo-RNR sąveikas. SR baltymų RS domeno serino aminorūgščių liekanų fosforilinimą vykdo SRPK (angl. *serine-arginine protein kinases*, SRPK) bei CLK (angl. *cell division cycle (CDC) like kinases*, CLK) baltymų šeimos kinazės (Jeong, 2017).

Be pagrindinių SR šeimos splaisingo reguliatorių, stuburiniuose gyvūnuose identifikuota ir daugiau RS domeną turinčių baltymų, kurie

priskiriami į SR panašių baltymų šeimai. Vienas iš tokių yra splaisingo veiksnys U2AF. Tai heterodimerinis veiksnys, sudarytas iš didesniojo 65 kDa (U2AF65) ir mažesniojo 35 kDa (U2AF35) subvienetų. U2AF65 baltymo sudėtyje nustatyti N-galinėje dalyje esantys RS sritis ir U2AF ligando motyvas ULM (angl. *U2AF ligand motif*) bei C-galinėje dalyje esantys du kanoniniai RRM domenai. Kanoniniai U2AF65 RRM domenai atpažįsta pre-iRNR intronuose esančią polipirimidininę seką (Py) ir prie jos jungiasi. Trečiasis netipinis RRM domenas, vadinamas U2AF homologiiniu motyvu (angl. *U2AF homology motif*, UHM), ir ULM domenas reikalingi formuojantis baltymo-baltymo sąveikoms su U2AF35 subvienetu. U2AF35 sekoje nustatyti C-galinėje dalyje esantis UHM ir N-galinėje dalyje esantis RS domenai (7 pav., A).

Heterodimerinis splaisingo veiksnys U2AF atlieka svarbų vaidmenį formuojantis ankstyvajam splaisosomos kompleksui, kai U2AF65 baltymas sąveikauja su polipirimidinine pre-iRNR seka, o U2AF35 subvienetas sąveikauja su 3' taikinio sekoje esančiais AG nukleotidais (7 pav., B). U2AF65 ir U2AF35 baltymų sąveika susidaro sąveikaujant šių baltymų ULM ir UHM domenams. Tuo pačiu metu splaisingo veiksnio SF1 sekoje esantis ULM domenas sąveikauja su U2AF65 baltymo UHM domenu. Šios baltymo-baltymo sąveikos stabilizuoja prie pre-iRNR prisijungusius splaisingo veiksnius ir tiesiogiai lemia 3' splaisingo taikinio sekos atpažinimą (Loerch ir Kielkopf, 2016).



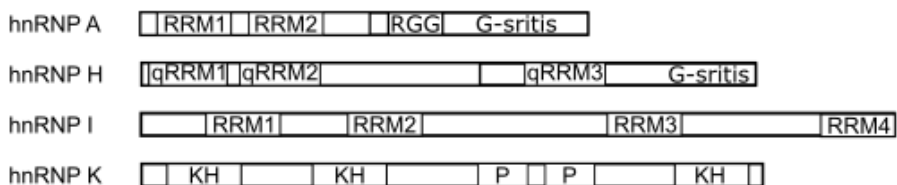
7 pav. Splaisingo veiksnį U2AF sudarantys baltymai ir jų tarpusavio sąveikos. *A* – splaisingo veiksnų U2AF65 ir U2AF35 baltymų struktūra. *B* – U2AF sudarančių subvienetų formuojamos ULM-UHM sąveikos. Čia RS – iš arginino ir serino aminorūgščių liekanų pasikartojančios sekos sudarytas domenas; RRM – sąveikos su RNR domenas; Zn – cinko pirštelių motyvas; W – U2AF ligando domene (ULM) esančios konservatyvios triptofano aminorūgšties liekana; išgaubimas žymi baltymų UHM domeną; A – šakojimosi taškas; Py – polipirimidininė seka (Loerch ir Kielkopf, 2016)

SR šeimos ir į juos struktūriškai panašūs baltymai yra svarbi genų raiškos reguliacinio mechanizmo dalis, tiesiogiai lemianti splaisingo efektyvumą ir specifiškumą (Grosso, Martins et al., 2008).

1.1.3.2. HnRNP splaisingo veiksniai

HnRNP splaisingo veiksniai yra didelė su RNR sąveikaujanti baltymų šeima, kurią sudaro 20 pagrindinių įvairios molekulinės masės (nuo 34 iki 120 kDa) baltymų. Šių baltymų struktūrai būdingi sąveikos su RNR domenai, kurių tipas ir kiekis kiekvieno hnRNP baltymo struktūroje varijuoja. HnRNP baltymų sekose nustatyti keturių tipų sąveikos su RNR domenai: klasikinis RNR atpažinimo motyvas RRM, kvazi-RNR atpažinimo motyvas qRRM, iš arginino ir dviejų glicino aminorūgščių liekanų sekos sudarytas RGG ir K homologinis 70 aminorūgščių liekanų motyvas KH (8 pav.). Pastarasis motyvas pirmą kartą nustatytas žmogaus splaisingo veiksnio hnRNP K sudėtyje. Šis konservatyvus motyvas dažnai pasitaiko įvairiuose su nukleorūgštėmis sąveikaujančiuose baltymuose. Nustatyta, kad RRM, qRRM bei KH domenai reikalingi hnRNP ir RNR sąveikai. RGG domenas dalyvauja susidarant homologinėms bei heterologinėms hnRNP baltymo-baltymo sąveikoms. Taip pat hnRNP baltymų sudėtyje nustatyti papildomi daug rūgštinių aminorūgščių (aspartato ir glutamo) liekanų turintys domenai bei daug prolino ir glicino aminorūgščių liekanų baltymo sekoje turintys domenai. Šių domenų išsidėstymas hnRNP baltymų sekose lemia unikalią kiekvieno baltymo erdvinę struktūrą, nuo kurios priklauso sąveikos su pre-iRNR substratais efektyvumas bei funkcijos (Dreyfuss, Kim et al., 2002).

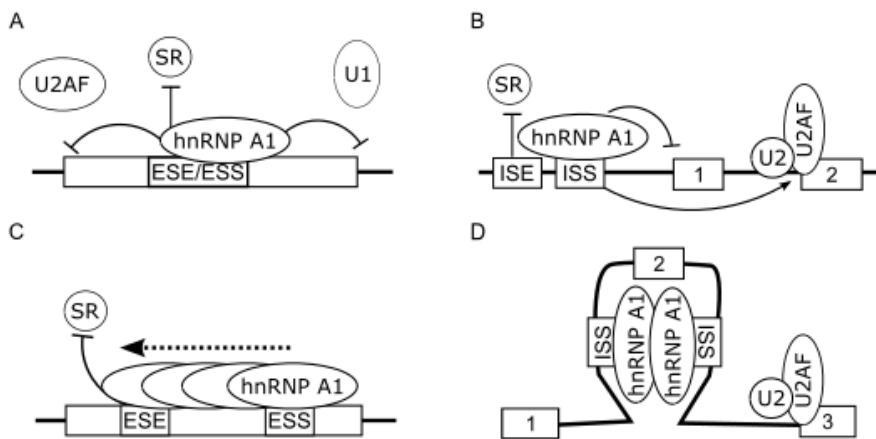
HnRNP baltymai yra ląstelės branduolyje, tačiau, dalyvaudami įvairiuose ląstelėse vykstančiuose procesuose, jie iš ląstelės branduolio pereina į



8 pav. HnRNP šeimos baltymų struktūra. Čia RRM – klasikinis sąveikos su RNR domenas, qRRM – kvazisąveikos su RNR domenas, KH – hnRNP K homologinis sąveikos su RNR domenas, G-sritis – iš glicino aminorūgšties liekanų pasikartojančios sekos sudaryta sritis, P – iš prolino aminorūgšties liekanų pasikartojančios sekos sudaryta sritis, RGG – sąveikos su RNR domenas (Geuens, Bouhy et al., 2016)

citoplazmą. Nustatyta, kad splaisingo veiksniai hnRNP A1, hnRNP I, hnRNP K, keliaudami į ląstelės citoplazmą, atlieka iRNR pernešimo funkciją: RNR sąveika su šiais hnRNP baltymais stabilizuoja ir iš branduolio į translacijos vietas citoplazmoje pristato susintetintus naujus iRNR transkriptus. Splaisingo veiksniai hnRNP AB, hnRNP C, hnRNP E, hnRNP Q bei hnRNP U lemia citoplazmoje esančios iRNR stabilumą. Šie baltymai sąveikauja su citoplazminėse granulėse esančiais iRNR transkriptais ir juos stabilizuoja. Splaisingo veiksnys hnRNP C iš branduolio į citoplazmą pernešamas ląstelės streso (pavyzdžiui, virusinės infekcijos) metu ir dalyvauja ląstelių atsako į stresą procesuose. Su telomeromis sąveikaujančiuose baltymų kompleksuose nustatytas splaisingo veiksnys hnRNP AB dalyvauja genomo stabilumą užtikrinančiuose procesuose (Han, Tang et al., 2010).

Splaisingo veiksniai hnRNP (išskyrus hnRNP U) yra svarbūs alternatyviojo ir konstitutinio splaisingo reguliatoriai (9 pav.). Dažniausiai hnRNP ir SR baltymai, sąveikaudami su pre-iRNR sekomis, konkuruoja tarpusavyje. HnRNP baltymų prisijungimas prie ESS sekų blokuoja SR baltymų prisijungimą prie gretimų ESE sekų ir susidarant iRNR skatina egzono, su kuriuo sąveikauja, praleidimą (9 pav., A). HnRNP sąveika su ISS



9 pav. HnRNP A1 alternatyviojo splaisingo reguliavimo mechanizmai. *A* – hnRNP ir SR konkurencija dėl sąveikos su pre-iRNR sekomis; *B* – hnRNP A1 sąveika su intronų reguliacinėmis sekomis skatina artimesniojo egzono išmetimą; *C* – kooperatyvinis hnRNP A1 jungimasis (punktyrinė rodyklė rodo kooperatyvinio hnRNP A1 baltymo jungimosi kryptį); *D* – tarp dviejų hnRNP A1 baltymų susidariusi baltymo-baltymo sąveika. Čia ISS / ISE ir ESS / ESE – introninės ir egzoninės splaisingo slopinimo / aktyvavimo sekos; SR – SR baltymai, U2AF – splaisingo veiksnys; U1 ir U2 – mažosios branduolio snRNP; rodyklės žymi pasirinktas alternatyviojo splaisingo taikinių sekas, brūkšniai – užblokuotas splaisingo taikinių arba baltymų sąveikos vietas, linija – intronas, langelis – egzonas (Jean-Philippe, Paz et al., 2013)

sekomis blokuoja artimiausių splaisingo taikinio sekų pasirinkimą dėl to pirmasis už introninės 3' galo sekos esantis egzonas į, besiformuojančią iRNR neįjungiamas (9 pav., B) (Spellman ir Smith, 2006). Prie ESS sekos prisijungęs hnRNP A1 sudaro baltymo-baltymo sąveikas ir inicijuoja savaiminį papildomų hnRNP A1 baltymų jungimąsi. Susidaręs hnRNP A1 baltymų kompleksas blokuoja ne tik gretimas, bet ir toliau esančias ESE sekas. (9 pav., C). Išskirtiniais atvejais prie kelių tolesnių ISS sekų prisijungę hnRNP baltymai sąveikauja tarpusavyje: suformuojama kilpos formos struktūra. Šioje struktūroje izoliuotas egzonas į besiformuojančios iRNR sudėtį neįjungiamas (9 pav., D) (Jean-Philippe, Paz et al., 2013).

1.1.3.3. Kitos pre-iRNR splaisingą reguliuojančių *trans* splaisingo veiksnių grupės

Pre-iRNR splaisingo reguliacijoje dalyvaujančius veiksnius į grupes jungia funkciniai arba struktūriniai panašumai. Pagal unikalios baltymų sekoje nustatytus domenus išskiriamos U2AF homologinį (UHM) domeną ir hnRNP K homologinį (KH) domeną turinčios baltymų šeimos (Richard, 2010, Loerch ir Kielkopf, 2016).

Išskirtinė UHM domenus turinčių baltymų savybė – susidarant UHM-ULM ryšiui formuojamos baltymo-baltymo sąveikos. Tokios sąveikos formuojasi tarpusavyje sąveikaujant splaisingo veiksnio 3b 115 kDa subvienetui (SF3b115) su UHM domeną turinčiais splaisingo veiksniais SPF45 (angl. *45kDa splicing factor*), PUF60 (angl. *poly(U)-binding-splicing factor 60*) ir RBM39 (angl. *RNA binding motif protein 39*). Veiksniai PUF60 ir CAPER α ląstelėse vykdo splaisingo reguliatorių ir transkripcijos koaktyviklių funkcijas (Loerch ir Kielkopf, 2016). Splaisingo veiksnys SPF45 yra alternatyviojo splaisingo reguliacijoje dalyvaujantis baltymas, kuris presplaisosomos komplekso susidarymo metu sąveikauja su prie U2 snRNP dalelės prisijungusiu SF3b115 baltymu. Susidariusi SF3b115-SPF45 sąveika keičia prie šakojimosi taško prisijungusios U2 snRNP stabilumą ir 3' splaisingo taikinio sekos atpažinimą (Loerch ir Kielkopf, 2016, Tari, Manceau et al., 2019).

KH baltymų šeimai priklausantis splaisingo veiksnys KHSRP (angl. *KH-type splicing regulatory protein*) yra su viengrandėmis DNR bei RNR sekomis sąveikaujantis baltymas, kurio sudėtyje nustatyti keturi sąveikai su RNR reikalingi KH domenai. KHSRP specifiškai atpažįsta G ir U nukleotidų pasikartojimų turinčias ISE sekas ir jungdamiesi prie jų daro įtaką introninių

sekų pašalinimui iš pre-iRNR. Nustatyta, kad prie pre-iRNR prisijungęs KHSRP sąveikauja su hnRNP F, hnRNP H ir hnRNP I splaisingo regulatoriais, kurių prisijungimas dar labiau sustiprina KHSRP reguliacines funkcijas (Min, Turck et al., 1997). KHSRP atpažįsta 3' UTR transkriptų srityse esančias A ir U nukleotidų pasikartojimų turinčias (angl. *adenylate-uridylylate-rich elements*, ARE) sekas. Sąveikaudamas su ARE sekomis, KHSRP prie nestabilių RNR transkriptų pritraukia RNR transkriptų degradaciją vykdančią egzomosos kompleksą. Nustatyta, kad splaisingo veiksnys KHSRP taip pat dalyvauja miRNR biogenezės, genų raiškos, imuninio atsako, ląstelių diferenciacijos ir kituose ląstelei svarbiuose procesuose (Briata, Bordo et al., 2016).

1.1.4. Ligas sukeliantys pre-iRNR splaisingo pokyčiai

Griežta pre-iRNR alternatyviojo splaisingo kontrolė ir tikslus introninių (egzoninių) sekų šalinimo (jungimo) mechanizmas užtikrina nenutrūkstamą organizmui gyvybiškai svarbių procesų eigą. Todėl alternatyviojo pre-iRNR splaisingo sutrikimai lemia daugelio patologinių organizmo būklių (Anna ir Monika, 2018). Ligas sukeliantys splaisingo pakitimai pasireiškia atsiradus pokyčių *cis* bei *trans* splaisingą reguliuojančiuose veiksmuose (Bonomi, Gallo et al., 2013).

Mutacijos – tai viena pagrindinių priežasčių, dėl kurių keičiasi splaisingo procesas. *Cis* reguliacinėse sekose pasitaikančios mutacijos lemia pasikeitusias pre-iRNR ir splaisosomos komponentų bei *trans* splaisingo veiksmų sąveikas. Dėl to pasikeitus pre-iRNR splaisingui susidaro pakitusios iRNR izoformos (Sterne-Weiler ir Sanford, 2014). Nustatyta, kad mutacijos kanoninėse pre-iRNR sekose lemia iki 10 % genetinių susirgimų. Didelis splaisingo taikinio sekose pasitaikančių mutacijų dažnis ląstelėse siejamas su įvairiomis onkologinėmis ligomis: atlikus bioinformatinę 8 656 navikų duomenų analizę, nustatytos net 1964 naujus splaisingo taikinius suformuojančios mutacijos (Jayasinghe, Cao et al., 2018). Mutacijos *cis* reguliacinėse sekose taip pat lemia pakitusių iRNR susidarymą. Nuo šių iRNR susintetinti baltymai daro įtaką B tipo hemofilijos, pigmentinės kserodermos, Stiklerio, Ehlers-Danlos (jungiamojo audinio liga) sindromo, neurofibrozės, Bekerio raumenų distrofijos, cistinės fibrozės, onkologinių ir kitų sunkių ligų vystymuisi (Takahara, Schwarze et al., 2002, Van de Water, Tan et al., 2004, Khan, Yamanegi et al., 2010, Symoens, Malfait et al., 2011, Sanz, Hollywood et al., 2017, Yang, Zhao et al., 2019).

Mutacijos *trans* splaisingo veiksnius koduojančiuose genuose pirmą kartą nustatytos mielodisplazijos sindromu sergantiems pacientams, o vėliau nustatytos ir kitų onkologinių susirgimų atveju. Tiriant navikus, ypač didelis mutacijų dažnis nustatytas SF3b155, U2AF35, SRSF2 baltymus koduojančiuose genuose. Pigmentinio retinito atveju mutacijos nustatytos splaisingo veiksnius PAPI1, HPRP3, PRPF8 ir PRPF31 koduojančiuose genuose. Dėl šių mutacijų sutrinka U4/U5/U6 trinarį snRNP kompleksą sudarančių baltymų sintezė (Cooper, Wan et al., 2009). *Trans* splaisingo veiksmių mutacijos sukelia šoninę amiotrofinę sklerozę, miotoninę distrofiją, autizmo stuburo raumenų atrofiją ir labai dažnai yra onkologinių susirgimų priežastis (Lefebvre, Burglen et al., 1995, Philips ir Cooper, 2000, Faustino ir Cooper, 2003). Visišką splaisosomos mechanizmo funkcijų praradimą sukeliančios *trans* splaisingo veiksmių mutacijos yra nesuderinamos su gyvybe (Wang ir Cooper, 2007).

Vieni svarbiausių pre-iRNR splaisingo procese dalyvaujančių *trans* veiksmių yra SR ir hnRNP šeimos baltymai, kurie, sąveikaudami su reguliacinėmis pre-iRNR sekomis, veikia kaip teigiami arba neigiami splaisingo reguliatoriai (Wang, Liu et al., 2015). Pakitusį iRNR susidarymą ląstelėje reguliuojančių veiksmių raiška yra tiesiogiai siejama su įvairiais organizme vykstančiais onkologiniais procesais (1 lentelė). Padidėjusi SR šeimos splaisingo veiksmio SRSF1 raiška nustatyta 20–50 % visų tirtų navikų (Karni, de Stanchina et al., 2007). Splaisingo veiksmys SRSF1, veikdamas kaip protoonkogenas, tiesiogiai inicijuoja pakitusių iRNR susidarymą, o nuo jų sintetinami baltymai skatina onkologinius procesus ląstelėse. Pavyzdžiui, padidėjusi splaisingo veiksmio SRSF1 raiška keičia BIN1, BIM, CASC9, MKNK2, S6K1, CASC4 pre-iRNR splaisingą ir skatina antiapoptozinių ir ląstelių proliferaciją inicijuojančių iRNR izoformų susidarymą. Tai lemia krūties epitelio ląstelių transformaciją į vėžines ląsteles (Anczukow ir Krainer, 2016).

Kito SR šeimai priklausančio splaisingo veiksmio SRSF2 raiškos pokyčiai taip pat siejami su įvairiomis onkologinėmis ligomis. Plaučių bei inkstų karcinomos ląstelių linijose nustatytas splaisingo veiksmio SRSF2 raiškos sumažėjimas keičia apoptozę reguliuojančių genų (pvz., CFLAR, kaspazės (CASP) 8 ir 9, BIM, MCL1, TRAIL) pre-iRNR splaisingą. Susidariusios iRNR izoformos lemia padidėjusį šių ląstelių atsparumą apoptozei (Kedzierska, Poplawski et al., 2016).

Splaisingo veiksmio U2AF raiškos pokyčiai taip pat yra kelių onkologinių procesų priežastis. Kasos bei gaubtinės žarnos karcinomos ląstelėse nustatytas splaisingo veiksmio U2AF35 raiškos sumažėjimas lemia iRNR

1 lentelė. Navikai ir juose nustatyti splaisingo veiksmių raiškos pokyčiai (Anczukow ir Krainer, 2016)

Genas	Pokyčio tipas	Naviko tipas
<i>SRSF1</i>	↑	Plaučių, storosios žarnos, krūties, kiaušidžių, skydliaukės, plonųjų žarnų ir inkstų navikai
<i>SRSF2</i>	↑	Kiaušidžių navikai
<i>SRSF3</i>	↓	Kepenų navikai
<i>SRSF5</i>	↑	Kiaušidžių, gimdos kaklelio, plaučių, krūties, skrandžio, odos, blužnies, storosios žarnos, kepenų, skydliaukės ir inkstų navikai
<i>SRSF6</i>	↑	Plaučių, gaubtinės žarnos, krūties ir odos navikai
<i>SRSF10</i>	↑	Tiesiosios ir storosios žarnos navikai
<i>TRA2B</i>	↑	Krūties, kiaušidžių, storosios žarnos, plaučių ir gimdos kaklelio navikai
<i>hnRNP A1</i>	↑	Krūties, plaučių ir storosios žarnos navikai, glioblastoma
<i>hnRNP AB</i>	↑	Glioblastoma
<i>hnRNP H</i>	↑	Glioblastoma
<i>hnRNP K</i>	↓	Angiomiolipoma
	↑	Krūties, kepenų, odos, storosios, gaubtinės žarnos navikai, burnos ir stemplės plokščialąstelinės karcinomos
<i>hnRNP M</i>	↑	Krūties navikai
<i>hnRNP I</i>	↑	Krūties, kiaušidžių, storosios žarnos ir gleivinės navikai
<i>ESPR1,2</i>	↑ aba ↓	Krūties navikai ir burnos plokščialąstelinės karcinomos
<i>RBFox2</i>	↓	Kiaušidžių ir krūties navikai
<i>QKI</i>	↓	Plaučių, plokščialąstelinė ir didelių ląstelių karcinoma, prostatos navikai
<i>RBM5</i>	↓	Plaučių ir prostatos navikai
	↑	Krūties navikai
<i>RBM1</i>	↑	Krūties navikai

↑ – padidėjusi baltymo raiška, ↓ – sumažėjusi baltymo raiška.

izoformos, nuo kurios sintetinamas naviko ląstelių proliferaciją skatinantis gastrino receptorių susidarymą (Hellmich, Rui et al., 2000, Ding, Kuntz et al., 2002). Prostatos navikuose nustatyta padidėjusi U2AF65 baltymo raiška keičia androgeno receptoriaus pre-iRNR splaisingą, dėl to kinta nuo šios pre-iRNR susidarančių iRNR izoformų santykis. Padidėjęs prostatos navikams būdingos AR-V7 iRNR izoformos susidarymas lemia padidėjusią šios iRNR koduojamo neaktyvaus baltymo raišką. Tai siejama su greita ligos eiga ir didesniu pacientų mirštamumu (Liu, Xie et al., 2014).

HnRNP šeimos splaisingo veiksniai – dar viena su onkologinėmis ligomis siejama baltymų grupė. Smegenyse splaisingo veiksnys hnRNP AB skatina naviko vystymąsi aktyvinančių BIN1, WWOX, CFLAR, kaspazės 9, insulino receptoriaus iRNR susidarymą (Anczukow ir Krainer, 2016). Kepenų karcinomos ląstelių linijose bei kepenų karcinomos biopsijos mėginiuose nustatyta padidėjusi hnRNP A1 raiška keičia ląstelės paviršiaus

receptoriaus CD44 pre-iRNR splaisingą, t. y. skatina CDv6 iRNR susidarymą. Nuo šios iRNR susidarantis baltymas sąveikauja su įvairiais citokiniais (pavyzdžiui, epidermio augimo, kraujagyslių endotelio augimo, hepatocitų augimo veiksniais), todėl šio tipo navikinėms ląstelėms būdingas didesnis nei įprastas metastazinis aktyvumas (82).

Splaisingo veiksnio KHSRP raiškos padidėjimas skatina stemplės plokščialąstelinio naviko ląstelių augimą, migraciją ir invazyvumą. KHSRP raiškos sumažėjimas šiose ląstelėse slopina plokščiojo epitelio ląstelių virsmą mezenchiminėmis ląstelėmis (Fujita, Masuda et al., 2017). Nustatyta, kad KHSRP taip pat aktyvina ląstelių proliferaciją ir migraciją (Briata, Bordo et al., 2016). Esant nesmulkių ląstelių plaučių karcinomai, padidėjusi KHSRP raiška lemia naviko invazyvumą ir augimą. Šiuo atveju KHSRP veikia kaip iRNR stabilumą reguliuojantis veiksnys, kuris skatina Spry4 (angl. *protein sprouty homolog 4*) iRNR degradaciją. Spry4 baltymas slopina plaučių ląstelių proliferaciją bei migraciją, todėl šio baltymo raiškos sumažėjimas skatina navikų augimą (Bikkavilli, Zerayesus et al., 2017).

Padidėjusi splaisingo veiksnio SPF45 raiška nustatoma blužnies, krūties, tiesiosios žarnos, plaučių, kepenų bei prostatos vėžiniuose audiniuose (Sampath, Long et al., 2003). Nustatyta, kad padidėjusi SPF45 raiška lemia naviko ląstelių atsparumą chemoterapinių vaistų poveikiui (Perry, Shepard et al., 2005). SPF45 taip pat dalyvauja β -globino pre-iRNR splaisingo reguliacijoje. Padidėjusi splaisingo veiksnio SPF45 raiška lemia baltymo nekoduojančios β -globino iRNR izoformos susidarymą, o tai siejama su sunkiausios formos kraujo ligos β -talasemijos vystymusi (Graveley, 2002, Sampath, Long et al., 2003).

Visi pateikti pavyzdžiai rodo, kad pasikeitęs splaisingo procesas lemia daugybės ligų, ypač onkologinių, atsiradimą ir vystymąsi. Šiuo atveju labai svarbu nustatyti tiksliai pre-iRNR splaisingo pokyčių priežastis. Dėl to splaisingą reguliuojančių individualių veiksnių raiškos tyrimai išlieka labai aktualūs (Douglas ir Wood, 2011, Havens, Duelli et al., 2013).

1.1.5. iRNR izoformų reikšmė patogenezei

Pre-iRNR splaisingas yra labai svarbus įvairių ligų atsiradimą ir vystymąsi nulemiantis procesas. Pasikeitusi iRNR izoformų raiška yra aterosklerozės, hipertenzijos, diabeto, įvairių neurodegeneracinių ir onkologinių ligų priežastis (Douglas ir Wood, 2011, Di, Syafrizayanti et al., 2019).

1.1.5.1. Apoptozė: Fas pre-mRNR splaisingas

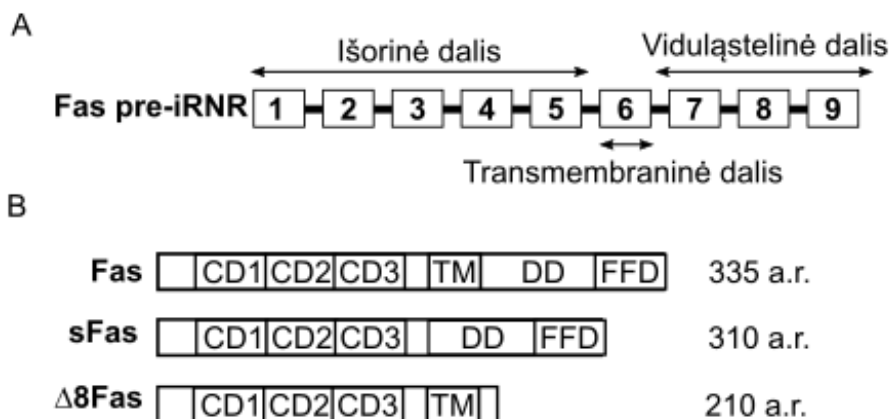
Tarp ląstelių proliferacijos ir žūties procesų nusistovėjusi pusiausvyra užtikrina nuolatinį organizmą sudarančių ląstelių atsinaujinimą. Esant poreikiui, reaguodamos į aplinkos ir (ar) endogeninius signalus, ląstelės geba aktyvuoti apoptozę. Apoptozė – tai fiziologinis genetiškai užprogramuotas procesas, kurio metu susinaikina organizmui nebereikalingos ir (ar) kenksmingos ląstelės. Šio proceso sutrikdymas dažnai lemia įvairius patologinius procesus. Pakitusi apoptozės procese dalyvaujančius baltymus koduojančių iRNR izoformų raiška nustatyta sergant neurodegeneracinėmis bei onkologinėmis ligomis (Paronetto, Passacantilli et al., 2016).

Navikų nekrozės veiksnio receptorių šeimai (angl. *tumor necrosis factor receptor*, TNFR) priklausantis Fas receptorius (angl. *Fas cell surface death receptor*, dar žinomas kaip APO-1/CD95/TNFRSF6) yra apoptozinį procesą ląstelėse reguliuojantis baltymas. Šis ląstelės membranoje esantis baltymas sudarytas iš N-galinėje dalyje esančių trijų cisteino aminorūgšties liekanų pasikartojimų turinčių domenu, transmembraninės ir viduląstelinės dalies. Ląstelės išorėje esanti N-galinė baltymo dalis reikalinga sąveikai su Fas ligandu (FasL). FasL – tai mažas navikų nekrozės veiksnio citokinų šeimai priklausantis baltymas, kuris atlieka tarpląstelinio signalo perdavimo funkciją (Lavrik ir Krammer, 2009). Kitaip nei daugelyje audinių sintetinamas Fas receptorius, FasL sintetina griežtai apibrėžtos ląstelių grupės, tokios kaip T ląstelės, natūralūs kileriai (angl. *natural killer*, NK) ir natūralių kilerių T ląstelės (NKT) (Aggarwal, 2003). FasL ląstelėse sintetinamas kaip membraninis arba laisvai tarpląstelinėje terpėje cirkuliuojantis baltymas. Ląstelių apoptozę aktyvuoja FasL ir membraninio Fas receptoriaus sąveika (LA, Tai et al., 2009). Ši sąveika sukelia konformacinius Fas receptoriaus pasikeitimus, kurie aktyvina ląstelės žūtį indukuojančio komplekso DISC (angl. *death-inducing signalling complex*) susirinkimą (Strasser, Jost et al., 2009).

Nustatyta, kad nuo Fas pre-iRNR susidaro 18 iRNR izoformų, tačiau eksperimentiškai patvirtinti tik trys baltymus koduojantys transkriptai: Fas, sFas ir $\Delta 8$ Fas iRNR (10 pav.). $\Delta 8$ Fas iRNR susidarymą lemia Fas pre-iRNR sekos 7 introno/8 egzono srities mutacijos, dėl to formuojasi 8 egzono sekos neturinti iRNR izoforma. Minėta iRNR izoforma koduoja trumpesnę C-galinę sritį turintį baltymą, kuris veikia kaip neigiamas viso ilgio Fas baltymo reguliatorius.

Fas iRNR formuojasi konstitutyviai sujungus visas 9 Fas pre-iRNR egzonines sekas. Nuo šios iRNR susidaro membraninis Fas baltymas.

Alternatyviojo splaisingo metu, iš Fas pre-iRNR sekos pašalinus 6 egzoną, susidaro sFas iRNR izoforma, o nuo jos sintetinamas transmembraninio domeno neturintis tirpus Fas (sFas) baltymas (Ruberti, Cascino et al., 1996). Tarpląstelinėje terpėje susikaupęs sFas ir membraninis Fas baltymas dėl sąveikos su FasL konkuruoja tarpusavyje: susidaręs sFas/FasL junginys į ląstelę apoptozinio signalo neperduoda ir DISC komplekso susirinkimas nevyksta. Dėl šių savybių sFas baltymas slopina membraninio Fas receptoriaus inicijuojamą apoptozę (Cascino, Papoff et al., 1996).



10 pav. Fas pre-iRNR ir baltymų izoformų struktūra. *A* – Fas pre-iRNR struktūra. Fas pre-iRNR sudaro 9 egzoninės sekos. Rodyklės žymi išorinę, transmembraninę ir viduląstelinę baltymo sritį koduojančias egzonines sekas; langeliai su numeriais – egzoninės sekos; linija – introninės sekos. *B* – alternatyvios Fas baltymų izoformos ir jų struktūriniai domenai. CD1, CD2 ir CD3 – cisteino aminorūgšties liekanų pasikartojimų turintys domenai, TM – transmembraninis domenas, DD – žūties domenas, FFD – sąveikos su fosfataze domenas (Itoh, Yonehara et al., 1991, Cascino, Papoff et al., 1996, Ivanov, Ronai et al., 2006)

Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo tyrimuose normaliomis aplinkos sąlygomis (21 % O₂) augintose ląstelėse naudojant Fas minigeno (t. y. minimali Fas geno seka, apimanti 5, 6 ir 7 egzonines bei tarp jų esančias intronines sekas) konstrukcijas nustatyti šeši šį procesą reguliuojantys veiksniai: hnRNP A1, hnRNP I, SPF45, Hu antigenas R (HuR) bei T ląstelių antigenas 1 (TIA-1). Nustatyta, kad skirtinga splaisingo veiksmų raiška veikia Fas pre-iRNR 6 egzono alternatyvųjų splaisingą. Parodyta, kad splaisingo veiksnio hnRNP A1 raiškos padidėjimas skatina Fas iRNR susidarymą (117). Padidėjusi splaisingo veiksnio SPF45 raiška skatina sFas iRNR izoformos susidarymą, o šio baltymo raiškos sumažėjimas aktyvina Fas iRNR izoformos sintezę (Al-Ayoubi, Zheng et al., 2012). Padidėjusi TIA-1 raiška ląstelėse skatina U1 snRNP jungimąsi prie Fas pre-iRNR 6

introno 5' taikinio sekos ir taip skatina Fas iRNR susidarymą. hnRNP I (PTB) raiškos padidėjimas aktyvina Fas pre-iRNR 6 egzono iškirpimą ir stimuliuoja sFas iRNR izoformos sintezę (Izquierdo, Majos et al., 2005). Priešingu veikimu pasižymi splaisingo veiksnys HuR, kurio raiškos padidėjimas skatina trumpos sFas iRNR izoformos susidarymą (Izquierdo, 2008).

Fas receptoriaus reguliuojamas apoptozinis mechanizmas susilaukė didelio tyrėjų dėmesio – buvo siekiama šį mechanizmą panaudoti kuriant progresyvias vėžio gydymo metodikas. Tačiau nuodugnesni tyrimai parodė, kad ne visos Fas receptorių sintetinančios ląstelės yra jautrios Fas receptoriaus inicijuojamai apoptozei (Timmer, de Vries et al., 2002). Alternatyvusis Fas pre-iRNR splaisingas yra vienas iš mechanizmų, dėl kurių ląstelės gali apeiti Fas/FasL sąveikos aktyvuotą apoptozę. Padidėję tirpaus sFas baltymo kiekiai nustatyti aktyvuotuose limfocituose bei navikų ląstelėse. Šis baltymas aptiktas pacientų, kuriems diagnozuoti įvairaus tipo kietieji augliai ar kitos piktybinės kraujotakos sistemos ligos, kraujo serumuose (Knipping, Debatin et al., 1995, Midis, Shen et al., 1996, Baldwin, Tran et al., 1999).

1.1.5.2. Rac1 onkogenas – ląstelių citoskeleto persitvarkymus inicijuojantis baltymas

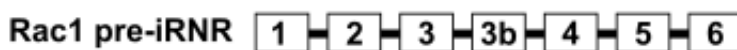
Su Rac susijęs C3 botulino toksino substratas *1* (angl. *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, Rac1) yra Rho mažųjų G baltymų (guanozino trifosfatų) šeimai priklausantis baltymas, dalyvaujantis ląstelių citoskeleto formavimosi ir persitvarkymo, ląstelės ciklo bei proliferacijos procesuose. Nustatyta, kad, skatindamas plazminės membranos išaugų formavimąsi ir adheziją, Rac1 tiesiogiai reguliuoja ląstelių migraciją (Bustelo, Ojeda et al., 2012). Šis baltymas yra svarbus neurogenezės veiksnys, kuris neuronuose inicijuoja ląstelės skeleto persitvarkymus, stimuliuoja aksonų augimą, dendritų susidarymą ir stuburo nervinio audinio morfogenezę (Govek, Newey et al., 2005). Rac1 baltymo raiška taip pat siejama su įvairiais organizme vykstančiais patologiniais procesais. Krūties vėžio atveju padidėjęs Rac1 aktyvumas lemia sunkesnę šios ligos formą (De, Carlson et al., 2017).

Rac1 baltymas veikia kaip molekulinis jutiklis, kuris ląstelėse egzistuoja kaip guanozin-5'-difosfatą (GDP) prisijungęs neaktyvus arba guanozin-5'-trifosfatą (GTP) prisijungęs aktyvus baltymas. Jungiantis GTP, N-galinėje baltymo dalyje esantys du funkciniai domenai keičia savo konformaciją ir

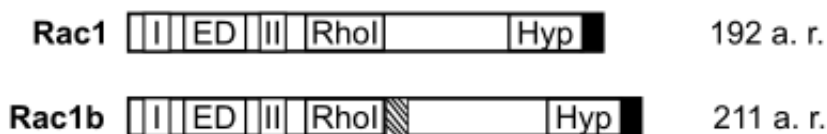
Rac1 baltymas tampa katalitiškai aktyvus. Kai Rac1 baltymo katalitiniame centre yra GDP, baltymas tampa neaktyvus (Cherfils ir Zeghouf, 2011). Neaktyvus GDP prisijungęs Rac1 baltymas ląstelės citoplazmoje sudaro kompleksą su GDI (angl. *GDP dissociation inhibitor*) baltymais. Šie stabilizuoja Rac1 ir GDP sąveiką. Pradiniame Rac1 aktyvacijos etape nuo komplekso disocijuoja GDI baltymai, o GDP/Rac1 baltymas susikaupia prie ląstelės membranos. Čia jis sąveikauja su GEF (angl. *guanine nucleotide exchange factors*) baltymais, kurie inicijuoja GDP disociaciją ir skatina GTP prisijungimą. Nuo komplekso disocijavus GEF baltymams, susidaro aktyvus GTP/Rac1 baltymas. Jis, vykstant GTP hidrolizei, skatina ląstelės aktino skeleto persitvarkymą. Prie aktyvaus Rac1 baltymo šiame etape prisijungia GTP hidrolizuojantįjį domeną aktyvuojantys baltymai (GAP). Jie reikiamu momentu papildomai padidina Rac1 baltymo GTP hidrolizės aktyvumą. Įvykus GTP hidrolizei, inicijuojami konformaciniai persitvarkymai, o susidaręs neaktyvus GDP/Rac1 baltymas grąžinamas į citoplazmą (Rossman, Der et al., 2005).

Rac1 baltymą koduojanti iRNR izoforma susidaro į vieną seką sujungiant 1, 2, 3, 4, 5 ir 6 egzonines sekas. Alternatyviojo splaisingo metu nuo Rac1 pre-iRNR taip pat susidaro papildomą 3b egzono seką turinti Rac1b iRNR izoforma (11 pav.). Ši izoforma koduoja baltymą, kurio sekoje už antrojo reguliacinio domeno įsiterpia papildomų 19 aminorūgščių liekanų intarpas (Jordan, Brazao et al., 1999). Įsiterpusios papildomos aminorūgščių liekanų sekos keičia Rac1b baltymo abiejų reguliacinių domenų konformaciją, todėl, skirtingai nuo Rac1, šis baltymas nuolat yra aktyvios būsenos.

A



B



11 pav. Rac1 pre-iRNR ir alternatyvios baltymų izoformos. A – Rac1 pre-iRNR struktūra. Rac1 pre-iRNR sudaro 6 egzoninės sekos. B – alternatyvios Rac1 baltymų izoformos ir jų struktūriniai domenai. I ir II – su ATP sąveikaujantys „jungtuko“ domenai, ED – efektoriaus domenas; RhoI – Rho intarpo domenas, Hyp – hipervariabilus domenas, juodas langelis – CAAX domenas (čia C – cisteino aminorūgšties liekana, A – alifatinės aminorūgšties liekana, X – bet kurios aminorūgšties liekana); brūkšniuotas langelis – 19 aminorūgščių intarpas (Vega ir Ridley, 2008, Fu, 2017)

Nustatyta, kad Rac1b baltymas nesąveikauja su GDI baltymais, todėl visada yra susijungęs su plazmine membrana ir nuolat vykdo ląstelės citoskeleto pertvarkymus. Tačiau, palyginti su Rac1, Rac1b baltymui būdingas mažesnis GTPazinis aktyvumas, todėl jo poveikis ląstelėje yra silpnesnis (Fiegen, Haeusler et al., 2004).

Tyrinėjant normaliomis aplinkos sąlygomis (21 % O₂) augintas ląsteles nustatyta keletas splaisingo veiksnių, kurie dalyvauja Rac1 pre-iRNR splaisingo reguliacijoje. Panaudojus Rac1 minigeno (apimančio 3, 3b ir 4 Rac1 egzonus ir tarp jų esančias intronines sekas) konstrukta nustatyta, kad padidėjusi splaisingo veiksnio SRSF1 raiška ląstelėse skatina 3b egzono įterpimą į Rac1 minigeno iRNR seką. O veiksnys SRSF3 veikia priešingai: šio splaisingo veiksnio padidėjimas aktyvina 3b egzono pašalinimą ir skatina Rac1 iRNR izoformos susidarymą (Goncalves, Matos et al., 2009). Taip pat parodyta, kad splaisingo veiksnys hnRNP A1, sąveikaudamas su 3b egzono seka, blokuoja šio egzono įjungimą ir skatina Rac1 iRNR susidarymą (Pelisch, Khauv et al., 2012).

Padidėjusi Rac1b raiška nustatyta gaubtinės žarnos, krūties, plaučių, sėklidžių, skydliaukės vėžio atvejais. Padidėjusi Rac1b raiška skatina vėžinių ląstelių proliferaciją ir inicijuoja ląstelių perėjimą iš G1 į S fazę. Kasos ir krūties vėžio atveju Rac1b baltymas slopina navikinių ląstelių augimą. Taip pat nustatyta, kad kasos, plaučių ir krūties vėžio atveju Rac1b baltymas siejamas su epitelinių ląstelių pasikeitimais ir jų virsmu į mezenchiminės ląsteles (Melzer, Hass et al., 2019).

1.2. Hipoksija

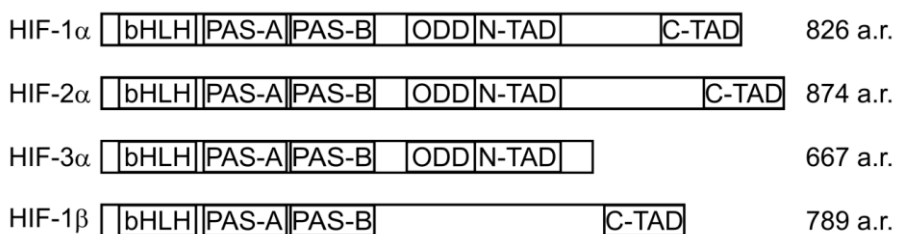
Visų organizmo audinių gyvybinėms funkcijoms palaikyti būtina ląsteles aprūpinti pakankamu kiekiu deguonies. Dėl to visuose vienaląsčiuose bei daugialąsčiuose organizmuose egzistuoja į deguonies kiekio svyravimus reaguojantis molekulinis mechanizmas. Hipoksija – tai reiškinys, kai ląstelėms ar audiniams trūksta deguonies. Fiziologinė hipoksija pasireiškia įvairiose embriono vystymosi stadijose ir suaugusių organizmų kaulų čiulpuose, kuriuose bręsta kraujo kamieninės ląstelės (Parmar, Mauch et al., 2007, Dunwoodie, 2009). Patologinė hipoksija būdinga gyjant žaizdoms, vystantis uždegimui, dėl įvairių ligų sutrikus kvėpavimo, kraujotakos sistemų veiklai (Giaccia, Simon et al., 2004). Onkologinių ligų atveju formuojantis navikams nekontroliuojamai besidauginančios naviko ląstelės tolsta nuo kraujagyslių: navikuose susidaro nepakankamai deguonimi aprūpintos (hipoksinės) zonos. Dėl šios priežasties hipoksija yra vienas iš

pagrindinių naviko ląstelių mikroaplinkos komponentų. Nustatyta, kad hipoksinė mikroaplinka daro įtaką vėžio agresyvumui, polinkiui į metastazes, atsparumui radioterapiniam bei chemoterapiniam gydymui (Bonomi, Gallo et al., 2013).

1.2.1. Hipoksijos indukuojami transkripcijos veiksniai (HIF)

Hipoksija ląstelėse inicijuoja adaptacinius persitvarkymus, kurių metu stabilizuojami hipoksijos indukuojami veiksniai (angl. *hypoxia inducible factors*, HIF). Šie veiksniai aktyvuoja atitinkamų genų, reikalingų ląstelei prisitaikyti ir išgyventi pakitusios aplinkos sąlygomis, transkripciją. HIF – tai heterodimeriniai transkripcijos veiksniai, sudaryti iš α - (HIF- α) ir β - (HIF- β) subvienetų. HIF- α ląstelėje veikia kaip deguonies jutiklis. HIF- β subvieneto, dar vadinamo ARNT (angl. *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), raiška nepriklauso nuo deguonies koncentracijos ir ląstelėse yra stabili.

Aukštesniuosiuose eukariotuose identifikuoti trys HIF- α subvienetai: HIF-1 α , HIF-2 α ir HIF-3 α (12 pav.) (Kaelin ir Ratcliffe, 2008). N-galinėje dalyje šie baltymai turi bHLH ir PAS domenų, atitinkamai reikalingus HIF- α ir HIF- β subvienetų dimerizacijai ir sąveikai su genų promotoriuose esančia konservatyviaja atsako į hipoksiją HRE (angl. *hypoxia response element*) sritimi. C-galinėje baltymo dalyje nustatytas nuo deguonies koncentracijos priklausomas degradacinis ODD (angl. *oxygen dependent domain*) domenas (Lee, Bae et al., 2004). Taip pat C-galinėje HIF-1 α ir HIF-2 α dalyje nustatyti N- ir C- transkripcijos aktyvacijos domenai (angl. *transcription activation domain*). HIF-3 α hipoksijos veiksnys C-TAD

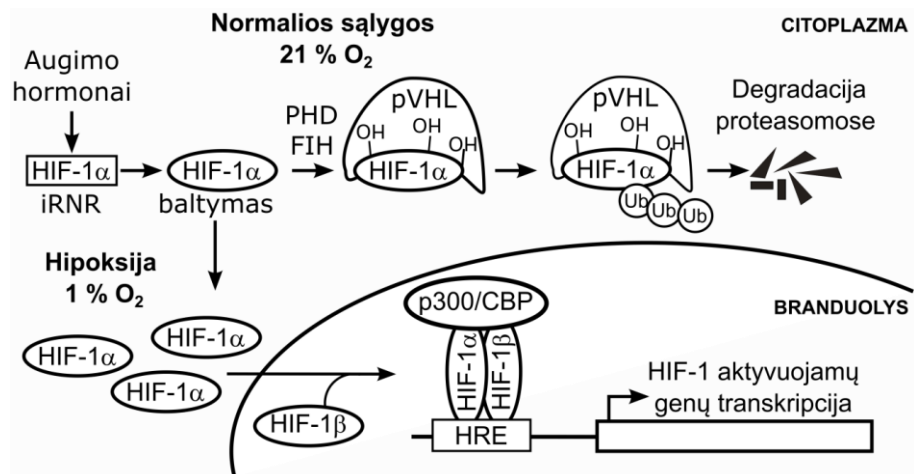


12 pav. Žmogaus HIF- α sudarančių baltymų struktūra. bHLH – bazinis domenas spiralė-kilpa-spiralė; PAS – Per-Arnt-Sim domenas; ODD – nuo deguonies priklausomas degradacijos domenas; N-TAD ir C-TAD – transkripcijos aktyvacijos domenai (Masoud ir Li, 2015)

motyvo neturi, todėl susidaręs HIF-3 kompleksas pasižymi silpnu transkripciniu aktyvumu. HIF-3, kaip hipoksijos veiksnio, funkcijos ištyrinėtos mažiausiai (Kewley, Whitelaw et al., 2004).

Iki šiol geriausiai ištyrinėtas hipoksijos indukuojamas veiksnys 1 (HIF-1). Šio veiksnio HIF-1 α subvieneto stabilumas, priklausomai nuo deguonies kiekio aplinkoje, kinta (13 pav.). Ląstelėse nuolatos vyksta HIF-1 α baltymo sintezė. Esant normaliai deguonies koncentracijai (21 %), fermentai prolilhidroksilazės (angl. *prolyl hydroxylase domain containing proteins*, PHD) hidroksilina baltymo ODD domene esančias prolinos aminorūgščių liekanas. Hidroksilintą HIF-1 α baltymą atpažįsta von Hippel-Lindau (pVHL) baltymas, kuris pasižymi E3 ubikvitino ligazėms būdingu aktyvumu. Sąveikaudamas su HIF-1 α , pVHL jį ubikvitilina: ubikvitinu pažymėtas HIF-1 α baltymas nukreipiamas į proteasomas ir yra degraduojamas (Kaelin ir Ratcliffe, 2008).

Aplinkoje trūkstant deguonies, HIF-1 α ODD domene esantys prolinai nehidroksilinami, todėl HIF-1 α stabilizuojamas ir keliauja į ląstelės branduolį. Čia formuojasi HIF-1 α /HIF-1 β dimeras. Jis, prisijungęs p300/CBP koaktyvatorius, tampa transkripciškai aktyvus. Susidaręs HIF-1 transkripcijos veiksnys sąveikauja su DNR sekoje esančiais HRE domenais ir aktyvuoja genų transkripciją (Kaelin ir Ratcliffe, 2008). Žmogaus ląstelėse HIF-1 aktyvuoja ląstelių proliferacijos, apoptozės, migracijos, adhezijos, eritropoezės, angiogenezės, citoskeleto struktūros susidarymo ir kituose



13 pav. Nuo deguonies priklausoma HIF-1 α reguliacija. Normaliomis sąlygomis HIF-1 α hidroksilinamas, ubikvitilinamas ir degraduojamas proteasomose. Hipoksijos sąlygomis HIF-1 α stabilizuojamas, keliauja į ląstelės branduolį ir dimerizuojasi su HIF-1 β . Susidaręs transkripciškai aktyvus HIF-1 heterodimeras sąveikauja su DNR sekoje esančiais atsako į hipoksiją elementais (HRE) ir aktyvuoja genų transkripciją (Masoud ir Li, 2015)

svarbiuose procesuose dalyvaujančių genų transkripciją. Daugelis HIF-1 aktyvuojamų genų siejami su eritrocitozės, infarkto, širdies nepakankamumo anemijos, plaučių arterinės hipertenzijos, periferinių ir vainikinių širdies arterijų, neurodegeneracinių, uždegimo sukeltų ir kitų ligų vystymusi (Semenza, 2014). HIF-1 α raiška nustatyta visų audinių ir ląstelių tipuose (Lee, Bae et al., 2004). Atliekant imunohistocheminius tyrimus, įvairiuose navikuose rastas stabilizuotas HIF-1 α baltymas, siejamas su agresyvesne ligos forma ir didesniu pacientų mirštamumu (Semenza, 2003).

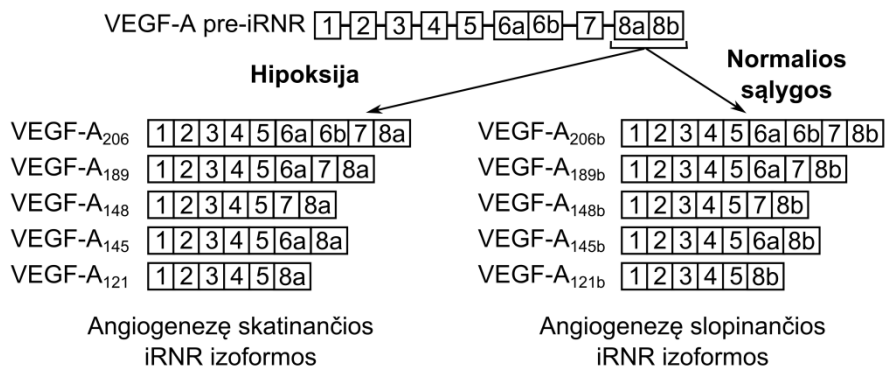
HIF-1 α transkripcinį aktyvumą reguliuoja oksigenazių šeimai priklausantis baltymas FIH-1 (angl. *factor inhibiting HIF*), katalizuojantis HIF- α C-TAD domene esančios asparagino aminorūgšties liekanos hidroksilinimą. Ši modifikacija blokuoja HIF-1 α sąveiką su transkripcijos koaktyvatoriais p300/CBP (angl. *E1A binding protein p300 / CREB binding protein*), todėl HIF-1 α transkripcinis aktyvumas slopinamas (Lando, Peet et al., 2002).

Transkripcijos veiksnio HIF-2 α subvienetas struktūriškai yra labai panašus į transkripcijos veiksnio HIF-1 α subvienetą (jie turi tuos pačius struktūrinius domenus, o jų aminorūgščių sekų homologiškumas siekia 48 %). Tačiau jie veikia šiek tiek skirtingai: HIF-1 α lemia greitą atsaką į hipoksiją, o HIF-2 α veikia kaip atsaką į lėtinę (>24 h) hipoksiją inicijuojantis transkripcijos veiksnys. HIF-2 α subvieneto raiška nustatyta plaučių, širdies, inkstų, plonosios žarnos audiniuose bei smegenų endotelio ląstelėse (Rankin ir Giaccia, 2008). HIF-2 α raiškos padidėjimas nustatytas daugelyje navikų ir yra siejamas su itin agresyviu neuroblastomos fenotipu (Makino, Cao et al., 2001).

1.2.2. Hipoksijos inicijuojami pre-iRNR splaisingo pokyčiai ir jų reikšmė ligų vystymosi procesuose

Hipoksinė mikroaplinka inicijuoja pre-iRNR splaisingo pakitimus (Kanopka, 2017). Atliekant RNR sekoskaitos tyrimus žmogaus kepenų ląstelių linijose, nustatyti net 3059 hipoksijos indukuoto alternatyviojo splaisingo atvejai. Tai rodo, kad splaisingas yra svarbus procesas, padedantis ląstelėms prisitaikyti prie kintančios mikroaplinkos (Bonomi, Gallo et al., 2013, Bowler, Porazinski et al., 2018). Nors tyrimais nustatyta tūkstančiai hipoksijos indukuojamo alternatyviojo splaisingo atvejų, tačiau eksperimentiškai patvirtinti tik keli tokie pavyzdžiai. Jie toliau aptariami išsamiau.

Kraujagyslių endotelio augimo veiksnio VEGFA (angl. *vascular endothelial growth factor A*) pre-iRNR sudaro 8 egzonišes sekos. Alternatyviojo splaisingo metu nuo tos pačios pre-iRNR gaunamos angiogenezę aktyvinančios VEGF-Axxx ir slopinančios VEGF-Axxx*b* iRNR izoformos (14 pav.). Esant normaliai deguonies koncentracijai, alternatyviojo splaisingo metu, į besiformuojančią iRNR jungiant tik 8b egzono seką, susidaro angiogenezę slopinančios VEGF-Axxx*b* iRNR izoformos. Hipoksinėje aplinkoje susidaro 8a egzono seką turinčios VEGF-Axxx iRNR izoformos. VEGFA baltymas yra kraujagyslių augimą ir angiogenezę aktyvinantis citokinas. Hipoksinėse navikų zonose iš navikinių ląstelių išsiskyręs VEGFA baltymas patenka į gretimų nenavikinių audinių ląsteles ir, sąveikaudamas su kraujagyslių endotelio augimo veiksnio receptoriu 2 (angl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR2), skatina endotelinių ląstelių proliferaciją, migraciją ir naujų kapiliarų susidarymą. Nors vykstanti angiogenežė onkologinių procesų nesukelia, tačiau ji padeda naviko ląstelėms apsirūpinti deguonimi, maisto medžiagomis ir taip palaiko naviko augimą. Sveikuose audiniuose vyrauja VEGF-Axxx*b* iRNR izoformos, kurių raiška vėžiniuose audiniuose slopinama (Biselli-Chicote, Oliveira et al., 2012).



14 pav. VEGF-A pre-iRNR alternatyvusis splaisingas normaliomis deguonies (21 % O₂) ir hipoksijos (1 % O₂) sąlygomis (Stevens ir Oltean, 2018)

Karboanhidrazės – tai anglies dioksido ir vandens sąveiką organizme katalizuojantys fermentai, dalyvaujantys kvėpavimo, kalcifikacijos, pH pusiausvyros palaikymo ir kituose procesuose. Karboanhidrazės IX (CAIX) pre-iRNR sudaro 11 egzonų (15 pav., A). Normaliomis aplinkos sąlygomis ląstelėse rasta trumpesnė iRNR izoforma, kuriai susidarant praleidžiami 8 ir 9 egzonai. Nuo šios iRNR sintetinamas silpnu katalitiniu aktyvumu pasižymintis citoplazminis AS CAIX baltymas. Hipoksinėmis aplinkos

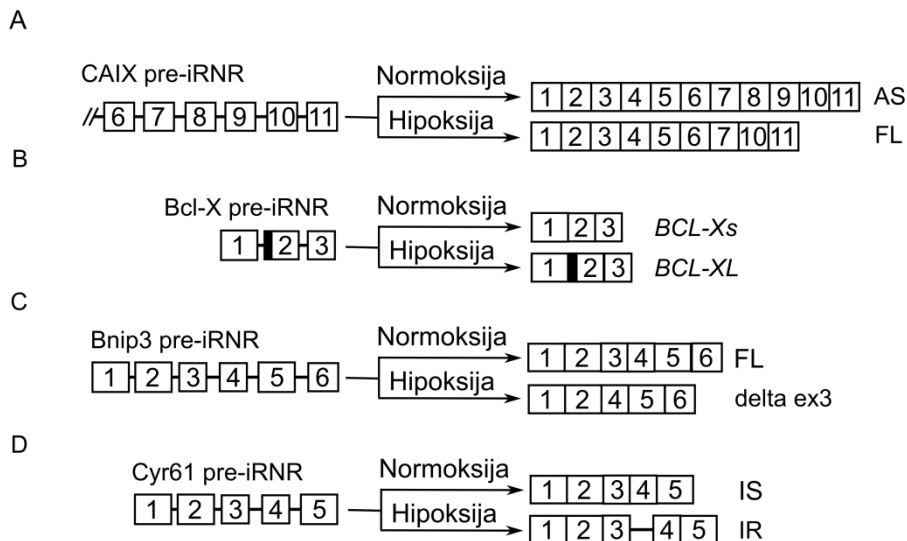
sąlygomis susidaro 8 ir 9 egzoniškos sekos turinti FL CAIX iRNR izoforma. Nuo šios iRNR sintetinamas ląstelės membranos baltymas (Pastorekova ir Gillies, 2019). Ląstelių išorėje išsidėstę CA IX katalitiškai aktyvūs centrai dalyvauja CO₂ hidratacijos reakcijoje. FL CAIX susidarymas ląstelėse tiesiogiai priklauso nuo hipoksijos, todėl šio baltymo raiškos padidėjimas yra laikomas ne konkrečia naviko tipo, o navikų hipoksinės mikroaplinkos biožymeniu. Navikuose nustatyta padidėjusi FL CAIX raiška siejama su agresyvia ligos forma ir dideliu pacientų mirštamumu (Benej, Pastorekova et al., 2014).

Nors Bcl-X pre-iRNR sudaro tik trys egzoniškos sekos, tačiau nuo jos ląstelėse susidaro Bcl-Xs ir Bcl-XL iRNR izoformos (15 pav., B). Šios iRNR izoformos gaunamos dėl antro egzono sekoje esančių dviejų alternatyvių 3' splaisingo taikinių sekų. Dėl to nuo trumpučio Bcl-x geno sintetinami du priešingomis funkcijomis pasižymintys baltymai: apoptozę slopinantis Bcl-XL ir ją skatinantis Bcl-Xs baltymas. Apoptozės reguliatorius Bcl-X yra išorinės mitochondrijų membranos baltymas, kuris ląstelėse reguliuoja reaktyvaus deguonies bei citochromo C pernašą per mitochondrijos membranos poras (Miura, Fujibuchi et al., 2012). Nustatyta, kad naujagimių patiriama hipoksija skatina Bcl-XL izoformos sintezę. Tyrimai su žmogaus ląstelių linijomis parodė, kad Bcl-Xs baltymo raiškos sumažinimas slopina nervinių ląstelių apoptozę ir taip sušvelnina hipoksijos sukeltus smegenų ląstelių pažeidimus (Xiao, Ford et al., 2012). Padidėjusi apoptozę slopinančio Bcl-XL baltymo raiška nustatyta krūties vėžio bei kepenų karcinomos atvejais ir siejama su didesniu šių navikų ląstelių atsparumu chemoterapiniams vaistams. Padidėjusi Bcl-xS baltymo raiška nustatyta sergant diabetu ir yra siejama su insuliną gaminančių kasos β ląstelių nykimu (Stevens ir Oltean, 2019).

BNIP3 pre-iRNR sudaro 6 egzoniškos sekos. Į besiformuojančios iRNR sudėtį įjungiant arba pašalinant 3 egzono seką, susidaro dvi alternatyvios iRNR izoformos: visus egzonus turinti BNIP3 ir savo sekoje 3 egzono neturinti BNIPΔ3 iRNR izoforma (15 pav., C). Nuo BNIP3 iRNR sintetinamas Bcl-2 šeimai priklausantis baltymas, kuris kaip atsaką į ląstelės patiriamą stresą inicijuoja ląstelių apoptozę. Hipoksinėje aplinkoje ląstelėse susidaranti BNIPΔ3 iRNR izoforma koduoja trumpesnį, BH3 ir transmembraninio domeno neturintį baltymą. Šis antiapoptozinėmis savybėmis pasižymintis baltymas ląstelėse slopina Bnip3 baltymo inicijuotus apoptozinius procesus. BNIP3 pre-iRNR alternatyviojo splaisingo pakitimai nustatyti sergant išemine širdies liga ar ištikus miokardo infarktui (Gang, Hai et al., 2011).

Nuo penkias egzonines sekas turinčios Cyr61 (angl. *cysteine-rich angiogenic inducer 61*) susidaro dvi alternatyvios iRNR izoformos: trumpesnė, visas egzonines sekas turinti Cyr61 IS bei ilgesnė, papildomą 3 introno seką turinti Cyr61 IR iRNR izoforma (15 pav., D). Šiuo atveju į iRNR įterpta introninė seka turi tris STOP kodonus, tačiau duomenų apie trumpesnio Cyr61 baltymo susidarymą kol kas nėra. Cyr61 IR iRNR raiška nustatyta krūties vėžio atveju, tačiau kol kas nėra žinoma, kaip ji veikia ir kokias funkcijas atlieka (Hirschfeld, zur Hausen et al., 2009). Cyr61 IS iRNR izoforma koduoja cisteino aminorūgščių liekanų pasikartojimų savo sekoje turintį angiogenezės aktyvklį. Šis ląstelių matricos signalinis baltymas dalyvauja ląstelių adhezijos, migracijos, proliferacijos, diferenciacijos, angiogenezės ir kituose procesuose (Hirschfeld, zur Hausen et al., 2009). Cyr61 baltymo raiška nustatyta įvairiose žmogaus embriono vystymosi stadijose: jis dalyvauja širdies pertvaros bei placentos kraujagyslių tinklo formavimosi procesuose. Padidėjusi Cyr61 baltymo raiška nustatyta sergant lėtinėmis uždegimo sukeltomis ligomis, ateroskleroze, diabeto sukelta nefropatija ir retinopatija bei endometrioze. Onkologinių ligų atveju nustatytas Cyr61 baltymo raiškos padidėjimas siejamas su didesniu ligos agresyvumu (Bleau, Planque et al., 2005).

Pateikti pavyzdžiai rodo, kad hipoksija ląstelėse keičia alternatyvųjų pre-iRNR splaisingą ir padeda ląstelėms prisitaikyti prie kintančios aplinkos



15 pav. Nuo hipoksijos priklausomas pre-iRNR splaisingas. A – CAIX pre-iRNR alternatyvusis splaisingas, B – Bcl-X pre-iRNR alternatyvusis splaisingas, C – Bnip pre-iRNR alternatyvusis splaisingas, D – Cyr61 pre-iRNR alternatyvusis splaisingas (Kanopka, 2017).

poveikio. Šis ląstelėse veikiantis hipoksinės mikroaplinkos valdomas genų raiškos reguliavimo mechanizmas yra labai svarbus įvairioms patologinėms būklėms vystytis (Kanopka, 2017).

1.3. Pre-iRNR splaisingas: vėžio diagnostika ir gydymas

Pre-iRNR splaisingo metu susidariusios tik navikų ląstelėms būdingos iRNR izoformos ar *trans* splaisingo veiksmų raiškos pokyčiai atlieka svarbų vaidmenį vystantis onkologinėms ligoms. Pastaruoju metu literatūroje daugėja informacijos apie tyrimus, kurių metu tikrinamos bei vertinamos su navikų vystymusi susijusių iRNR izoformų susidarymą slopinantys ar splaisingo veiksmų raišką reguliuojantys vėžio gydymo metodai (Brinkman, 2004, Desterro, Bak-Gordon et al., 2020). Tai mažų molekulių, nukreiptų prieš splaisosomos komponentus ar *trans* splaisingo veiksmus, panaudojimas ir specifinių oligonukleotidų terapija (Bonomi, Gallo et al., 2013).

1.3.1. iRNR izoformų susidarymą organizme reguliuojantys cheminiai junginiai

Chemoterapinis onkologinių ligų gydymas paremtas tuo, kad antivėžiniai preparatai labiausiai veikia nekontroliuojamai besidalijančias navikų ląsteles ir jas pražudo. Tačiau šis gydymas taip pat veikia sveikas organizmo ląsteles, o tai labai riboja skiriamas medikamentų dozes ir blogai veikia bendrą pacientų būklę, ligos eigą. Dėl šių priežasčių naujų antivėžinių cheminių junginių tyrimai išlieka labai aktualūs (Bonomi, Gallo et al., 2013).

Šiuo metu įvairiose klinikinių tyrimų stadijose tikrinami net keletas splaisosomos komponentų veikimą blokuojančių junginių. Vieni iš tokių yra specifiniai su splaisingo veiksmo SF3B 115 kDa subvienetu (SF3b115) sąveikaujantys cheminiai junginiai pladienolidai, splaisostatinai bei sudemicinai. Šie junginiai blokuoja U2 snRNP dalelės sąveiką su pre-iRNR, todėl splaisosomos kompleksas nesiformuoja ir splaisingas nevyksta. SF3B dažniausiai dalyvauja ląstelės ciklą bei antiapoptozinius procesus reguliuojančių genų pre-iRNR splaisingo procese. Navikinėse ląstelėse šių genų raiška yra ypač aktyvi, todėl SF3b115 inhibitoriai specifiškai veikia būtent navikines ląsteles (Corrionero, Minana et al., 2011).

Klinikinių tyrimų etapą jau pasiekė ir keli splaisosomos komponentus modifikuojančių baltymų funkcijas slopinantys cheminiai junginiai. Vieni iš tokių yra arginino N-metiltransferazės 5 (PRMT5) inhibitoriai. PRMT5 yra

Sm baltymų metilinimą vykdomas fermentas, be kurio snRNP dalelių susirinkimas nevyksta. Įvairiuose augliuose nustatyta padidėjusi PRMT5 raiška siejama su padidėjusiu pacientų mirštamumu. PRMT5 inhibitoriai sėkmingai panaudoti mantijos ląstelių limfomos, glioblastomos ksenograftiniuose auglių modeliuose: šie inhibitoriai sumažina naviko ląstelių augimą (Desterro, Bak-Gordon et al., 2020).

Šiuo metu taip pat intensyviai tiriami splaisingo proceso reguliacijoje dalyvaujančių baltymų serino kinazių SRPK ir CLK inhibitoriai. Nustatyta, kad SRPK1 ir SRPK2 kovalentiniai slopikliai efektyviai sumažina SR baltymų RS domeno fosforilinimo lygį ir taip lemia pre-iRNR splaisingo pasikeitimus. Antivėžiniu veikimu pasižymi ir CLK inhibitoriai. Tačiau tiek SRPK, tiek CLK inhibitorių naudojimas onkologinių ligų atveju šiuo metu dar yra preklinikinėje stadijoje (Hatcher, Wu et al., 2018, Iwai, Yaguchi et al., 2018).

1.3.2. Oligonukleotidų terapijos taikymas

Oligonukleotidų (angl. *antisense oligonucleotides*, ASO) terapijos pagrindas yra trumpi 15–25 bazių porų oligonukleotidai, kurie sumodeliuoti taip, kad specifiskai jungtųsi prie splaisingui svarbių pre-iRNR sekų. Prie pre-iRNR egzono ir introno sandūroje prisijungiantys ASO blokuoja splaisingo taikinio sekas ir trukdo splaisosomos susirinkimui. Dėl to pasirinkta splaisingo taikinio seka nepanaudojama. ASO yra chemiskai modifikuoti, todėl tarp jų ir pre-iRNR susidaro labai stabili sąveika. Visiems naudojamiems oligonukleotidams bendra tai, kad: jie komplementariai jungiasi prie pre-iRNR; jų prisijungimo vietos yra specifinės ir tiksliai apibrėžtos – tokio tipo sąveika niekaip nekeičia ląstelės genomo. Dažniausiai prie savo taikinio ASO nugabenami pasinaudojant nanodalelėmis, kurios neturi toksinio poveikio ir yra stabilios.

Šiuo metu ASO technologijų pagrindu sukurti du preparatai sėkmingai naudojami Diušeno raumenų distrofijos bei spinalinės raumenų atrofijos simptominiam gydymui (Charleston, Schnell et al., 2018, Michelson, Ciafaloni et al., 2018).

Intensyviai tiriamos onkologinėms ligoms gydyti skirtos ASO terapijos pritaikymo galimybės. Ląstelių linijose atliekamų antivėžinės ASO terapijos preklinikinių tyrimų rezultatai teikia daug vilčių (2 lentelė). Nustatyta, kad, ląstelių linijose panaudojus ASO technologijas ir inicijavus alternatyviojo splaisingo pokyčius, ląstelėse aktyvuojama apoptozė, stabdomi ląstelių augimo ir diferenciacijos procesai. ASO tyrimai ksenograftiniuose auglių

2 lentelė. Preklininiai ASO taikymo tyrimai (Desterro, Bak-Gordon et al., 2020)

Pre-iRNR	ASO taikymo rezultatai	Modelinė sistema
BCLX (dar vadinamas BCL2L11)	Vietoj ląstelių apoptozę skatinančios BCL-XL baltymo izoformos susidaro BCL-XS baltymo izoforma.	Prostatos, krūties ir gimdos kaklelio vėžinės ląstelių linijos B16F10 pelės melanomos ląstelės ir B16F10 navikų ksenograftų modeliai Žmogaus gliomos ląstelių linijos
STAT3	Vietoj su augliais siejamos STAT3 α baltymo izoformos sintetinamas proapoptozinis STAT3 β baltymas.	Vėžinės ląstelių linijos: MDA-MB-435s, MDA-MB-468, MDA-MB-453, HeLa, A459, K562,4T1 ir B16 MDA-MB-453s navikų ksenograftų modeliai
PKM	Pasikeitus splaisingui, vietoj PKM2 baltymo izoformos, būtinos deguoniniam gliukozės skaidymui ir naviko augimo procesams, susidaro navikinių ląstelių apoptozę aktyvinanti PKM1 baltymo izoforma.	Žmogaus glioblastomos ląstelių linijos
MKNK2	Vietoj onkogeninio Mnk2 baltymo susidaro naviką slopinantis Mnk2a baltymas.	Žmogaus glioblastomos ląstelių linijos U87MG ir U251MG, krūties vėžinė ląstelių linija MDA-MB-231, kepenų vėžinė ląstelių linija HuH7, U87MG ksenografiniai auglių modeliai
ERBB4 (dar žinomas kaip HER4)	Inicijuojamas onkogeninės HER4 baltymo izoformos pasikeitimas į naviko augimą slopinančią baltymo izoformą.	Žmogaus krūties vėžinės ląstelių linijos MCF7 ir T47D, MCF7 ksenografiniai auglių modeliai
INSR	Inicijuojamas onkogeninės INSR baltymo izoformos pasikeitimas į naviko augimą slopinančią baltymo izoformą.	Minkštųjų audinių sarkomos ląstelių linija
MDM4	Pasikeitus alternatyviajam splaisingui, susidaro MDM4 iRNR izoforma. Ji degraduojama kaip beprasmė RNR.	Žmogaus melanomos ląstelių linijos bei melanoma sergančių pacientų navikinių ląstelių ksenografiniai augliai
BRCA1	Pasikeitus alternatyviajam splaisingui, susidaro trumpesnė BRCA1 baltymo izoforma, kuri ląstelėse neatlieka DNR pažaidų taisymo funkcijos. Dėl to navikinės ląstelės tampa jautresnės antivėžiniams vaistams.	Žmogaus krūties vėžinė ląstelių linija MCF7

Pre-iRNR	ASO taikymo rezultatai	Modelinė sistema
ERBB2 (dar žinomas kaip HER2)	Pasikeitus alternatyviajam splaisingui, susidaro autoinhibicinėmis savybėmis pasižyminti HER2 baltymo izoforma.	Žmogaus krūties vėžinės ląstelių linijos SK-BR-3 ir MCF7
BIM (dar žinomas kaip BCL2L11)	Pasikeitus alternatyviajam splaisinigui, susidaro proapoptozinėmis savybėmis pasižyminti BIM baltymo izoforma.	Žmogaus lėtinės mieloidinės leukemijos ląstelių linijos K562 ir KCL22

BCLX (arba BCL2L1) – į BCL2 panašus BCL-2 šeimos baltymas *1* (angl. *BCL2-like protein 1*); BIM (arba BCL2L11) – į BCL2 panašus baltymas *11* (angl. *BCL2-like protein 11*); HER2 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių *2* (angl. *human epidermal growth factor receptor 2*); HER4 – žmogaus epidermio augimo veiksnio receptorių *4* (angl. *human epidermal growth factor receptor 4*); INSR – insulino receptorių; MDM4 – su p53 sąveikaujantis Mdm2 tipo baltymas (angl. *Mdm2-like p53-binding protein*); Mnk2 – su MAP kinaze sąveikaujanti serino ir treonino baltymų kinazė *2* (angl. *MAP kinase-interacting serine and threonine-protein kinase 2*); PKM – piruvatkinazė *M*; STAT3 – transkripcijos veiksnys (angl. *signal transducer and activator of transcription 3*).

modeliuose parodė, kad taikant ASO antivėžinę terapiją augliai ima nykti (Desterro, Bak-Gordon et al., 2020). Taip pat kuriamos ASO terapijos, kuriose naudojami su įvairiais splaisingo veiksniais sąveikaujantys oligonukleotidai. Šie oligonukleotidai sukonstruoti iš kelių atsikartojančių su *trans* splaisingo veiksniais sąveikujančių reguliacinių pre-iRNR sekų. Dėl šios priežasties su ASO susijungę splaisingo veiksniai su pre-iRNR nesąveikauja. Tokiu būdu slopinamos splaisingo veiksmų funkcijos. Šiuo metu intensyviai tiriama splaisingo veiksmų SRSF1 blokuojanti ASO terapija. Tikimasi, kad ši terapija bus efektyvi augliams, kuriuose padidėjusi splaisingo veiksmo SRSF1 baltymo raiška (Denichenko, Mogilevsky et al., 2019).

Vystoma dar viena ASO metodika, kuria siekiama reguliuoti iRNR transkripto poliadenilinimo procesus. Pirmą kartą ši metodika pritaikyta panaudojant VEGFR pre-iRNR alternatyvias poliadenilinimo signalines (APA) sekas. ASO sąveika su specifinėmis VEGFR pre-iRNR sekomis lėmė alternatyvių APA pasirinkimą. Dėl to susidarė tirpūs angiogenezę slopinančiomis savybėmis pasižymintys VEGFR1 ir VEGFR2 baltymai. Nors dar nepasiekta preklininių tyrimų stadija, šia kryptimi intensyviai dirbama (Desterro, Bak-Gordon et al., 2020).

Apibūdintos onkologinėms ligoms gydyti skirtos ASO terapijos vienaip ar kitaip veikia ląstelėse vykstančius pre-iRNR splaisingo procesus. Nepaisant to, duomenų apie naviko ląstelėse vykstančius alternatyviojo splaisingo pakitimus ir juos lemiančius veiksmus vis dar trūksta. Tik išsamūs pre-iRNR splaisingo reguliacijos mechanizmo tyrimai ir nuodugni jį

reguliuojančių veiksnių analizė gali suteikti papildomų duomenų, leisiančių ateityje sukurti pažangius, selektyvius ir efektyvius onkologinių ir kitų ligų gydymo būdus (Bonomi, Gallo et al., 2013).

1.3.3. Onkologiniai biožymenys: diagnostika ir prognozė

Naviko ląstelėse pre-iRNR splaisingo metu susidarančios iRNR izoformos dažnai yra naudojamos kaip onkologinių ligų diagnostiniai biožymenys. Pavyzdžiui, skirtingi ABCC1, Mdm2 bei fibronektino iRNR izoformų raiškos pokyčiai vertinami atliekant sveikų audinių ir epitelinio kiaušidžių vėžinio audinio diferencinę diagnostiką. Pasikeitusi MED24, MFI2, SRRT ir CD44 iRNR izoformų raiška liudija apie besivystantį agresyvų, į metastazes linkusį krūties vėžio fenotipą, kuris gerokai mažina pacientų išgyvenamumą. Žmogaus aktiną reguliuojančio baltymo MENA (angl. *mammalian-enabled protein*) pakitusios iRNR izoformos nustatytos ankstyvosios stadijos krūties vėžio atveju ir labai pasitarnauja pasirenkant tolesnes gydymo strategijas. KLF6 bei kaspazės 9 alternatyvių iRNR izoformų santykis ir jo pasikeitimai siejami su vėžinių ląstelių atsparumu chemoterapijai, todėl yra labai reikšmingi renkantis kitus ar tarpusavyje derinant kelis vėžio gydymo būdus (Bonomi, Gallo et al., 2013).

Pakitusi alternatyvųjų splaisingą reguliuojančių *trans* splaisingo veiksnių raiška taip pat signalizuoja, kad organizme vyksta onkologiniai ar kiti patologiniai procesai. Splaisingo veiksnių (SRSF1, SRSF2, SRSF3, hnRNP A, hnRNP I, hnRNP K, SPF45 ir kt.) raiškos pokyčiai nustatyti įvairiuose vėžiniuose audiniuose, tačiau tikslus mechanizmas, kuris augliuose skatina įvairių splaisingo veiksnių raiškos pasikeitimus, kol kas nėra iki galo aiškus. Būdai, kaip *trans* splaisingo veiksniai galėtų būti panaudojami onkologinių ligų diagnostikai, diferenciacijai, ligos eigai prognozuoti ir stebėti, šiuo metu intensyviai tiriama (Anczukow ir Krainer, 2016).

2. MEDŽIAGOS IR TYRIMŲ METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

Agarozė; bromfenolio mėlis; etilendiamintetraacto rūgštis (EDTA); glicerolis; natrio hidrofosfatas; tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris), *Tween-20*; mielių ekstraktas; triptono peptono mišinys; 4-(2-hidroksietil)-1piperazin-etansulfonrūgštis (HEPES); chloroformas; fenolis; glicinas; pieno milteliai; Kumasio briliantinio mėlio dažas R-250; hidrochinonas; izopropilo alkoholis; natrio tiosulfatas; Nonidet P-40, *Tween-20* (*Roth*, Vokietija).

Fetalinis veršiuko serumas (FBS); L-glutaminas; penicilinas / streptomocinas; puromocinas, tripsinas / EDTA (*Biochrom*, Vokietija).

Acto rūgštis; 2-merkaptioetanolis (*Merck*, Vokietija).

Chromatografinis popierius; nitroceliuliozinė baltymų pernešimo membrana (*Whatman*, *Schleicher & Schuell*, Vokietija).

1 × proteazių inhibitorius (*Roche Diagnostics*, Vokietija).

Dulbecco modifikuota *Eagle* terpė (DMEM) (*Lonza*, Šveicarija); McCoy's 5A ląstelių auginimo terpės (*Gibco*).

N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas (TEMED); akrilamidas; bisakrilamidas; amonio peroksodisulfatas (APS); fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF); betainas; kalio fluoridas; ksilencianolis; natrio bikarbonatas; guanidino hidrokloridas, TMB reagentas; (*Merck*, Vokietija)

Boro rūgštis; jaučio serumo albuminas (BSA); etidžio bromidas; kalio chloridas; kalio dihidrofosfatas; kalio bromidas; kalio hidroksidas; kalio fosfatas; natrio chloridas; natrio dioksicholiatas, natrio hidroksidas; natrio acetatas; natrio karbonatas; natrio azidas; natrio sulfitas; natrio dodecilsulfatas (SDS); ditiotreitolis (DTT); metilo alkoholis; magnio chloridas; amonio acetatas; amonio sulfatas; amonio chloridas; kalcio chloridas; kreatinfosfatas; ličio chloridas; metolis; polivinilo alkoholis (PVA); puromocinas; ampicilinas; ficolio reagentas; tripano mėlis; izopentilo alkoholis, *fenil-metil-sulfonil-fluoridas*(PMSF), *ditiotreitolas* (DTT) (*Sigma*, JAV).

Deoksinukleotidų mišinys (dNTP); Bradfordo reagentas (*Coomassie Plus*); *Ponceau S*; LMP agarozė; dimetilsulfoksidas (DMSO), baltymo-G dalelė (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

Druskos rūgštis (*Chempur*, Lenkija).

Etilo alkoholis (*Vilniaus degtinė*, Lietuva).

Skystas azotas (*Achema*, Lietuva).

2.1.2. Tirpalai

DNR elektroforezei:

1 × Tris – acetatinis buferinis tirpalas (TAE) (pH 7,2): 40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA (pH 8,0).

Agarozės gelio tirpalai: 1 %, 1,5 % agarozės 1 × TAE buferiniame tirpale.

1 × Tris – boratinis buferinis tirpalas (TBE) (pH 8,0): 45 mM Tris, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA.

Etidžio bromido tirpalas: 0,5 µg/ml etidžio bromidas.

Baltymų elektroforezei:

1 × baltymų elektroforezės buferinis tirpalas: 25 mM Tris, 250 mM glicinas, 0,1 % SDS.

2 × baltymo mėginio dažas: 0,12 M Tris (pH 6,8), 4 % SDS, 20 % glicerolis, 25 mM EDTA (pH 8,0), 20 % bromfenolio mėlis, 2 % 2-merkaptoetanolis.

Akrilamido ir bisakrilamido tirpalas: 30 % akrilamidas, 0,8 % bisakrilamidas.

Amonio peroksosulfato tirpalas: 10 % amonio peroksosulfatas.

SDS tirpalas: 10 % SDS.

1,5 M Tris tirpalas: 1,5 M Tris (pH 8,8).

1 M Tris tirpalas: 1 M Tris (pH 6,8).

Imunohibridizacijai *Western blot* metodu:

1 × baltymų pernešimo buferinis tirpalas: 26 mM Tris, 108 mM glicinas, 20 % metanolis.

1 × PBS buferinis tirpalas: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄.

1 × TBST buferinis tirpalas: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 M EDTA tirpalas (pH 8,0), 0,05 % *Tween-20*.

Blokavimo buferinis tirpalas: 5 % pieno milteliai 1 × TBST buferiniame tirpale.

Mitybinės terpės:

HCT 116 ląstelių auginimo terpė: McCoy's 5A terpė, 10 % FBS, 2 mM L-glutaminas, 100 U penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišinys.

Visoms kitoms ląstelėms auginti naudota ląstelių auginimo terpė: DMEM terpė, 10 % FBS, 2 mM L-glutaminas, 100 U penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišinys.

LB terpė *E. coli* auginti: 1 % triptono ir peptono mišinys, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl.

Agarizuota LB terpė: 1,5 % agaro LB terpėje.

Šaldymo terpė: 10 % DMSO fetaliniame veršiuko serume.

10 x T4 DNR ligavimo buferis:

500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM dithiothreitolo, 10 mM ATP, pH 7.6.

Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas:

MgCl₂ tirpalas: 0,1 M MgCl₂.

CaCl₂ tirpalas: 0,1 M CaCl₂.

Laikymo tirpalas: 0,1 M CaCl₂, 12 % glicerolis.

Plazmidinės DNR skyrimo tirpalai:

TE buferinis tirpalas: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0).

NaOH-SDS tirpalas: 1 % SDS, 0,1 M NaOH.

Natrio acetato tirpalas (pH 4,8): 3 M CH₃COONa.

LiCl tirpalas: 10 M LiCl.

TER buferinis tirpalas: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 µg/ml RNazė.

Ląstelių lizavimo tirpalas

Ripa buferis: 150 mM natrio chlorido, 50 mM Tris tirpalo (pH 8,7), 1 % Nonidet P-40, 0,5 % natrio deocholiatas, 0,1 % SDS, 2 mM ditiotreitolas, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoridas, 0,2 mM N-metilmaleimidis, 1 × proteazių inhibitorius.

2.1.3. Rinkiniai

DNR skyrimo iš agarozės gelio rinkinys *GeneJET™ Gel Extraction Kit*, plazmidinės DNR gryninimo rinkinys *Quick-DNA Miniprep Kit* (*Zymo Research*), atvirkštinės transkripcijos rinkinys *RevertAid™ RT Kit*, realaus laiko PGR rinkinys *Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2)*, citoplazminio ir branduolių ekstrakto skyrimo rinkinys *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV) ir RNR skyrimo iš eukariotinių ląstelių rinkinys *Quick-RNA™ Miniprep Kit* (*Zymo*

Research); mirVANA™PARIS™ Protein and RNA Isolation System (Life Technologies).

2.1.4. Oligonukleotidai DNR amplifikacijai PGR ir qPGR metodais ir gRNR sintezei

Oligonukleotidai buvo gauti iš *Metabion* (Vokietija) (3 lentelė).

3 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai (pradmenys)

Metodas	Pavadi-nimas	Pradmenų sekos
PGR	Fas(D)	5'-d(GTGAACACTGTGACCCTTGC)3'
	Fas(R)	5'-d(CCTTGGTTTTCTTTCTGTGC)-3'
	Fas total (D)	5'-d(TGAGGGAAGCGGTTTACGAG)-3'
	Fas total (R)	5'-d(TGAAAGAGCTTCCCCAACTCC)-3'
	Rac1(D)	5'-d(GAAAACCGGTGAATCTGGGC)-3'
	Rac1(R)	5'-d(CGCACCTCAGGATACCACTT)-3'
	18S (D)	5'-d(AACTCACTGAAGATGAGGTG)-3'
	18S (R)	5'-d(CAGACAAGGCCTACAGACTT)-3'
qPGR	qFas v1(D)	5'-d(GGGGTGGCTTTGTCTTCTTCT)-3'
	qFas v1(R)	5'-d(CCACTGTTTCAGGATTTAAAGTTGG)-3'
	qFas v2(D)	5'-d(ACCCGGACCCAGAATACCA)-3'
	qFas v2(R)	5'-d(TTCTCTTCACTTCTCTTTGCAC)-3'
	Ac(D)	5'-d(GACAGGATGCAGAAGGAGAT)-3'
	Ac(R)	5'-d(TTGCTGATCCACATCTGCTG)-3'
sgRNR koduojančių sekų sintezė	h-prm (D)	5'-d(CACCGGTCTACCAATGCCGAAAGCG)-3'
	h-prm (R)	5'-d(AAACCGCTTTCGGCATTGGTAGACC)-3'
	h-ex1 (D)	5'-d(CACCGTGCCGTCATGTCTAAGTCAG)-3'
	h-ex1 (R)	5'-(AAACCTGACTTAGACATGACGGCAC)-3'
	RBM-prm (D)	5'-(CACCGACCATCAAGAGGTGTCGCC)-3'
	RBM-prm (R)	5'-(AAACGGGCGACACCTCTTGATGGTC)-3'
	RBM-ex1 (D)	5'-(CACCGCCACTCTAGGTCATCGTAC)-3'
	RBM-ex1 (R)	5'-(AAACGTACGATGACCTAGGAGTGGC)-3'
U6 (D)	5'-(CGTAACTTGAAAGTATTCGATTTCTGGC)-3'	

2.1.5. Monokloniniai ir polikloniniai antikūnai

Pirminiai antikūnai:

monokloniniai pirminiai antikūnai: triušio anti-U2AF35 (Abcam, ab172614); anti-KHSRP (Abcam, ab150393); anti-Fas (Abcam, ab133619); anti-hnRNP A1 (Abcam, ab177152); pelės anti-actin (Abcam, ab3280); anti- U2AF65 (Santa CruzBiotechnology, sc-53942); anti-HIF-1α (*BD Biosciences*, JAV);

polikloniniai pirminiai antikūnai: triušio anti-SFRS2 (Abcam, ab28428); anti-SFRS1 (Abcam, ab38017); anti-RBM17 (Abcam, ab204333).

Antriniai antikūnai:

Polikloniniai ožkos antriniai antikūnai prieš triušio (Dako, P 0447) ir pelės (Dako, P 0448) IgG, konjuguoti su krienų peroksidaze.

2.1.6. Ląstelių linijos, mikroorganizmų kamienai ir plazmidinės DNR

Branduolių ekstraktams skirti ir ląstelių lizatams ruošti naudotos ląstelių linijos pateiktos 4 lentelėje.

4 lentelė. Darbe naudotos ląstelių linijos

Kilmė	Pavadinimas	Apibūdinimas
Kasa	PANK-1	Žmogaus kasos latakų karcinomos ląstelių linija
	SU.86.86	Žmogaus kasos latakų karcinomos ląstelių linija išvesta iš metastazinių židinių kepenyse
	T3M4	Žmogaus kasos karcinomos ląstelių linija
	Capan-1	Žmogaus kasos karcinoma, išvesta iš metastazinių židinių kepenyse
Inkstai	CaKi-1	Inkstų skaidriųjų ląstelių karcinomos ląstelių linija kilusi iš metastazinių židinių odoje
	786-O	Inkstų adenokarcinomos ląstelių linija
Gaubtinė žarna	HCT116	Gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linijos
	COLO 205	Gaubtinės žarnos adenokarcinomos ląstelių linija išvesta iš pilvaplėvės ertmės skysčiuose esančių metastazinių židinių ląstelių
Skrandis	KATOIII	Skrandžio karcinomos ląstelių linija, kilusi iš metastazinių židinių limfmazgiuose
Plaučiai	A549	Žmogaus alveolių bazinio epitelio adenokarcinomos ląstelės
Gimdos kaklelis	Hela	Gimdos kaklelio adenokarcinomos ląstelės
Embrionas	HEK 293A	Embrioninės inkstų ląstelės su įterptu 5 tipo adenoviruso genu

Virškinimo trakto vėžinių ląstelių linijos gautos iš LSMU Virškinimo sistemos tyrimų instituto Chirurginės gastroenterologijos laboratorijos vadovo prof. A. Gulbino.

HEK 293A ir A549 ląstelių linijos gautos iš VU GMC Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus ląstelių banko.

Hela ląstelių linija gauta iš Švedijos, Karolinoskos instituto.

E. coli DH5 α kamienas buvo naudojamas plazmidinių DNR transformacijai (*Thermo Fisher Scientific*, JAV).

Cas9 raiškos vektorius pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459) (Addgene Nr. 62988); laboratorijoje specifinių genų redagavimui sukonstruoti CRISPR/Cas9-gRNR vektoriai: pSpCas9(BB)/h-prm; pSpCas9(BB)/h-ex1; pSpCas9(BB)/RBM-prm; pSpCas9(BB)/RBM-ex1.

2.1.7. Virškinimo trakto organų augliai ir sveiki audiniai

Kiekvienas šiame darbe naudotas biopsijos mėginys buvo paimtas tik gavus kiekvieno paciento raštiką sutikimą ir užtikrinant, kad bus laikomasi visų Pasaulinės medicinos organizacijos nustatytų etikos normų.

Pirminiai kasos navikų mėginiai chirurginiu būdu gauti iš 12 pacientų, kuriems, siekiant pašalinti kasos navikus, atlikta rezekcija. Nė vienam iš šių pacientų prieš operaciją nebuvo paskirtas nei chemoterapijos, nei radioterapijos gydymo kursas. Pagal Tarptautinės vėžio draugijų sąjungos patvirtintą TNM klasifikaciją, visi kasos navikiniai audiniai gauti iš T3 kasos navikų. Visi gauti navikų mėginiai padalinti į dvi grupes. Pirmos grupės mėginiai buvo atiduoti standartiniam mediciniam patikrinimui. Antros grupės mėginiai buvo užšaldyti skystame azote ir iki tolimesnių tyrimų saugomi – 80 °C temperatūroje. Išanalizavus hematoksilinu – eozinu dažytus histologinius kasos mėginius nustatyta, kad navikinės ląstelės visuose mėginiuose sudaro ne mažiau nei 80 % visų mėginio ląstelių. Patologinė ekspertizė patvirtino, kad visi tirti mėginiai yra kasos lataukų adenokarcinoma. Pagal Amerikos vėžio draugijų sąjungos parengtas klasifikacijos gaires, visi tirti navikai priskiriami vidutiniškai (G2) arba prastai (G3) diferencijuotų navikų klasei. Kontroliniai (sveiki) kasos audinių pavyzdžiai gauti iš sveikų donorų po daugybinių organų eksplantacijos.

14 skrandžio navikų audinių pavyzdžių buvo gauti operuojant skrandžio navikus. Histologiniai tyrimai patvirtino, kad visi mėginiai yra prastai diferencijuotos (G3) adenokarcinomos. Nė vienam iš šių pacientų prieš operaciją nebuvo paskirtas nei chemoterapijos, nei radioterapijos gydymo kursas. Taip pat nė vienam pacientui nebuvo diagnozuotas kitas onkologinis susirgimas. Visi gauti navikų mėginiai padalinti į dvi grupes. Pirmos grupės mėginiai buvo atiduoti standartiniam mediciniam patikrinimui. Antros grupės mėginiai buvo užšaldyti skystame azote ir iki tolimesnių tyrimų saugomi – 80 °C temperatūroje. Tyrimais patvirtinta, kad navikinės ląstelės visuose mėginiuose sudaro ne mažiau nei 80 % visų mėginio ląstelių.

Kontroliniai (sveiki) skrandžio audinių pavyzdžiai gauti atliekant bariatricines operacijas, kurios atliekamos gydant nutukimą.

14 gaubtinės žarnos navikų pavyzdžių gauta atliekant gaubtinės žarnos navikų šalinimo operacijas. Pacientai, kuriems taip pat diagnozuoti tiesiosios žarnos onkologiniai susirgimai, iš šio tyrimo pašalinti. Nė vienam iš šių pacientų prieš operaciją nebuvo paskirtas nei chemoterapijos, nei radioterapijos gydymo kursas. Visi gauti navikų mėginiai padalinti į dvi grupes. Pirmos grupės mėginiai buvo atiduoti standartiniam medicininiam patikrinimui. Antros grupės mėginiai buvo užšaldyti skystame azote ir iki tolimesnių tyrimų saugomi – 80 °C temperatūroje. Histopatologiniai tyrimai patvirtino, kad visi mėginiai yra vidutiniškai (G2) arba blogai (G3) diferencijuotos T3 klasės gaubtinės žarnos adenokarcinomos. Kontroliniai (ne navikiniai) gaubtinės žarnos mėginiai gauti iš gėrybinėmis gaubtinės žarnos ligomis (pavyzdžiui, divertikulitu) sergančių pacientų atliekant planines žarnyno operacijas.

2.1.8. Molekulinės masės standartai

DNR fragmentams agaroziniame gelyje atpažinti naudotas *GeneRuler™ DNR Ladder Mix* (#SM0331) molekulinės masės standartas ir 6 x *DNR Loading Dye* mėginių dažas (*Thermo Fisher Scientific, JAV*).

Naudotas *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* baltymų molekulinį masių standartas (#26616, *Thermo Fisher Scientific, JAV*) ir pačių padarytas baltymų mėginių dažas.

2.1.9. Fermentai

Taq DNR polimerazė; ribonukleazų inhibitorius RNasin; T4 DNR ligazė; T4 polinukleotid-kinazė (PTK); DNR endonukleazė; ribonukleazės A/T1; proteinazė K; atvirkštinė transkriptazė *RevertAid H Minus M-MuLV*, restrikcijos endonukleazė BpiI (*Thermo Fisher Scientific, JAV*).

2.1.10. Bioinformatinės programos

Baltymų ir iRNR izoformų raiškos rezultatai skaičiuoti pasinaudojant MultiGaude Programine įranga ne mažiau kaip iš trijų nepriklausomų eksperimentų.

Statistinis visų eksperimentų patikimumas skaičiuotas pagal Mann Whitney neparametrinį testą naudojant R statistinę programinę įrangą, kurioje naudoti duomenys gauti iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų. Iš qRT-PCR tyrimo gautu duomenys išanalizuoti dviejų imčių Stjudento T testu. Gautos statistinės reikšmės: *** $p < 0.005$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. DNR ir RNR tyrimo metodai

2.2.1.1. DNR fragmento amplifikacija polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu

Mišinio sudėtis vienam mėginiui: 1 × *Taq* buferinis tirpalas su $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 mM dNTP mišinys, 50 pmol tiesioginis pradmuo, 50 pmol atvirkštinis pradmuo, 2 mM MgCl_2 , 1 vnt. *Taq* DNR polimerazės, 0,5–1 μg DNR, H_2O iki 20 μl. Reakcija vykdoma termocikleryje naudojant 2.1 lentelėje pateiktus pradmenis pagal rekomenduojamas sąlygas (5 lentelė):

5 lentelė. Reakcijos taikant PGR metodą sąlygos

1.	95 °C	5 min.	1 ciklas
2.	95 °C	30 s.	
3.	T_m °C	30 .	23–40 ciklų
4.	72 °C	1 kb/min.	
5.	72 °C	5 min.	1 ciklas

T_m – pradmenų lydymosi temperatūra.

2.2.1.2. DNR fragmento amplifikacija kiekybinio realaus laiko PGR (RT-qPGR) metodu

Mišinio sudėtis vienam mėginiui: 2 × Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 12.5 μl, 0,3 μM tiesioginis pradmuo, 0,3 μM atvirkštinis pradmuo, iki 0.5 μg DNR, H_2O iki 25 μl. Reakcija vykdoma termocikleryje naudojant 3 lentelėje pateiktus qPGR pradmenis pagal rekomenduojamas sąlygas (6 lentelė.)

6 lentelė. Reakcijos taikant qPGR metodą sąlygos.

1.	95 °C	10 min.	1 ciklas
2.	95 °C	15 s.	
3.	T_m -°C	15s .	23–40 ciklų
4.	72 °C	1 kb/min.	
5.	72 °C	5 min.	1 ciklas

2.2.1.3.DNR elektroforezė

Paruošiamas atitinkamos koncentracijos agarozės gelis (1–1,5 %), mėginys sumaišomas su $1 \times$ DNR Loading Dye mėginių dažu ir vykdoma DNR elektroforezė $1 \times$ TAE buferiniame tirpale esant 10 V/cm įtampai. Po elektroforezės gelis 10 min. dažomas etidžio bromido tirpalu ir DNR fragmentai vizualizuojami UV šviesoje.

2.2.1.4.DNR fragmento skyrimas agarozės gelyje

Reikiamo dydžio DNR fragmentas išpjaunamas UV šviesoje ir iš agarozės gelio išskiriamas naudojant *GeneJetTM Gel Extraction Kit* rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.1.5.Koncentracijos nustatymas

Nukleorūgščių koncentracija nustatoma spektrofotometriniu būdu, naudojant NanoDrop spektrofotometrą (*Thermo Fisher Scientific*). Šviesos sugertis matuojant, kai bangos ilgis yra 260 ir 280 nm. A_{260}/A_{280} santykis parodo mėginio švarumą.

2.2.1.6.DNR skaldymas restrikcijos endonukleazėmis

Restrikcijos reakcijos mišinio sudėtis: apie 1 μ g plazmidinės DNR arba 0,2 μ g PGR fragmento, $1 \times$ restrikcijos endonukleazių veikimo buferinis tirpalas, 10 vnt. atitinkamų restrikcijos endonukleazių, H₂O iki 10 μ l. Mišinio inkubacijos laikas, temperatūra ir buferiniai tirpalai parenkami pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.1.7.DNR fragmento įjungimas į plazmidinę DNR (ligavimas)

Ligavimo reakcijos sudėtis: 100 ng restrikcijos endonukleazių paveikta plazmidinė DNR, 50 ng restrikcijos endonukleazių paveiktas PGR fragmentas, $1 \times$ T4 ligazės veikimo buferinis tirpalas, 5 vnt. T4 DNR ligazės, H₂O iki 10 μ l. Ligavimo mišinys inkubuojamas 1 val. kambario temperatūroje.

2.2.1.8. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas

E. coli DH5α ląstelės 16 val. auginamos 5 ml LB terpėje kratytuve 37 °C temperatūroje, kol suspensijos optinis tankis 600 nm bangos ilgio šviesoje pasiekia 0,5. Ląstelės surenkamos, atšaldomos ledo vonioje ir 15 min. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 1280 × g. Supernatantas nupilamas ir ląstelės suspenduojamos 25 ml atšaldyto 0,1 M MgCl₂ tirpalo, 15 min. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 1280 × g. Nupylus supernatantą, ląstelės suspenduojamos 25 ml atšaldyto 0,1 M CaCl₂ tirpalo. Suspensija 20 min. inkubuojama ledo vonioje ir 10 min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 1280 × g. Supernatantas nupilamas, ląstelės suspenduojamos laikymo tirpale, išskirstomos į mėgintuvėlius, užšaldomos skystame azote ir saugomos –70 °C temperatūroje. Jos nepraranda kompetentiškumo iki 6 mėn.

2.2.1.9. Plazmidinės DNR įterpimas į kompetentines *E. coli* ląsteles (transformacija)

Atliekant transformaciją, norima padauginti plazmidinę DNR ar ligavimo mišinys sumaišomas su 100 μl kompetentinių *E. coli* ląstelių vienam mėginiui. Mišinys 0,5–1 val. inkubuojamas ledo vonioje, po to sukeliamas ląstelių temperatūrinis šokas – mėginys 2 min. perkliamas į 42 °C temperatūrą ir vėl atšaldomas. Ligavimo mišinys užpilamas 1 ml LB terpės, 1 val. inkubuojamas 37 °C temperatūroje ir 1 min. centrifuguojamas esant 1280 × g. Sterilioje aplinkoje supernatantas nupilamas, paliekant apie 100 μl, ir ląstelės suspenduojamos. Suspenduotos ląstelės užsėjamos ant kietos agarizuotos LB terpės su reikiamu kiekiu antibiotiko (antibiotiko koncentracija 100 μg/ml) Petri lėkštelėje, 16 val. inkubuojamos 37 °C temperatūroje oro termostate.

2.2.1.10. Transformacijos bakterijų kolonijose tikrinimas

Paruošiamas reikiamas PGR reakcijos mišinio po 20 μl kiekvienam mėginiui. Mišinys išpilstomas į PGR mėgintuvėlius. Sterilioje aplinkoje naudojamos inokuliacines kilpeles po vieną užkalbintos kolonijos perkiamos į PGR mišinį intensyviai maišant. Tuomet ta pačia kilpele perbraukiama per iš anksto paruoštą Petri lėkštelę. Ta pati procedūra kartojama visoms testuojamoms baterijų kolonijoms. Lėkštelė su persėtomis

kolonijomis inkubuojama 37 °C temperatūroje 16 h tolimesniam naudojimui. PGR reakcijos mėginiai dedami į termocinklerį ir vykdoma PGR reakcija. Po reakcijos mėginiai tikrinamai agaroziniame gelyje. Atsirenkami tinkamo ilgio apmlifikuotą fragmentą turintys mėginiai.

2.2.1.11. Plazmidinės DNR išskyrimas

Mažų plazmidinės DNR kiekių (iki 25 µg) išskyrimui naudotas „Quick-DNA Miniprep” (*Zymo Research*) rinkinys, darbus atliekant pagal gamintojo nurodytas rekomendacijas.

Didesniems (virš 25 µg) plazmidinės DNR kiekiams išskirti, DNR su įterptu fragmentu turinti *E. coli* kolonija užsėjama į 100 ml LB terpės su reikiamu kiekiu antibiotiko (antibiotiko koncentracija 100 µg/ml) ir 16 val. auginama kratytuve 37 °C temperatūroje. Po auginimo *E. coli* ląstelės atšaldomos ledo vonioje ir 20 min. centrifuguojamos 4 °C temperatūroje esant 3500 × g. Terpė nupilama, ląstelės suspenduojamos penkis kartus mažesnio tūrio nei pradinis tūris TE buferiniame tirpale. Į ląstelių suspensiją pridedama 2 tūriai NaOH-SDS tirpalo, ir mišinys 5 min. inkubuojamas kambario temperatūroje. Po to pridedama 0,5 tūrio atšaldyto 3 M natrio acetato tirpalo, 10 min. inkubuojama ledo vonioje ir 15 min. centrifuguojama 4 °C temperatūroje esant 3500 × g. Plazmidinė DNR iš supernatanto išsodinama pridėjus 0,7–0,8 tūrio izopropilo alkoholio ir 15 min. centrifuguojama kambario temperatūroje esant 3500 × g. Gautos nuosėdos suspenduojamos du kartus mažesnio tūrio nei pradinis tūris TE buferiniame tirpale, ir vėl visa procedūra pakartojama, kol gaunamos nuosėdos. Gautos nuosėdos tirpinamos penkis kartus mažesnio tūrio nei pradinis tūris TE buferiniame tirpale. Mėginys sumaišomas lygiu tūriu su 10 M LiCl tirpalo, 5 min. inkubuojamas kambario temperatūroje ir 20 min. centrifuguojamas 4 °C temperatūroje esant 20000 × g. Supernatantas surenkamas, pridedama 0,7–0,8 tūrio izopropilo alkoholio, 30 min. centrifuguojama kambario temperatūroje esant 20000 × g. Nuosėdos suspenduojamos 0,5 ml TE buferinio tirpalo ir 1 val. inkubuojama 37 °C temperatūroje su 10 µg/µl ribonukleazių A/T1 mišiniu. Plazmidinė DNR gryninama mėginį lygiu tūriu sumaišomas su fenolio, chloroformo, izopentilo alkoholio mišiniu, 2 min. purtomas purtyklėje didžiausiu greičiu ir 5 min. centrifuguojamas 4°C temperatūroje esant 16000 × g. Vandeninis sluoksnis surenkamas ir lygiu tūriu maišomas su chloroformo ir izopentilo alkoholio mišiniu, 2 min. intensyviai purtomas purtyklėje ir 5 min. centrifuguojamas 4 °C temperatūroje esant 16000 × g. Vandeninis sluoksnis surenkamas, į jį

pridedama 2,5 tūrio 95 % etilo alkoholio ir 3 M natrio acetato tirpalo iki galutinės 0,3 M tirpalo koncentracijos, apie 16 val. inkubuojamas –20 °C temperatūroje. Nuosėdos surenkamos 30 min. centrifuguojant 4 C temperatūroje esant 16000 × g, praplaunamos 70 % etilo alkoholio tirpalu ir tirpinamos TE buferiniame tirpale arba steriliame vandenyje.

2.2.1.12. Plazmidinių DNR, skirtų baltymų raiškos sumažinimui ląstelių linijose, konstravimas

Specifinės SPF45 ir hnRNP A1 genų redagavimui skirtos sekos, pasirinktos naudojantis CRISPR bioinformatine programa (<http://tools.genome-engineering.org>), pateiktos 2.1 lentelėje. Gauti liofilizuoti pradmenys ištirpinami steriliame vandenyje, kad kiekvienas jų koncentracija būtų 100 µl. Paruošiamas reakcijos mišinys: 10 µM tiesioginis pradmuo, 10 µM atvirkštinis pradmuo, 1x T4 DNR ligavimo buferis; 0.5 U/reakciją T4 PNK. Paruoštas mėginys inkubuojamas termocikleryje: 30 min 37 °C; 5 min 95 °C ir tuomet temperatūra mažinama iki 25 °C taip, kad per 1 min ji sumažėtų 5 °C. Gautas mišinys, santykiu 1:10 skiedžiamas vandenyje.

Cas9 raiškos vektorius pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459) veikiamas restrikcijos endonukleazė BbsI, valomas nuo reakcijos mišinio ir į jį ligavimo metodu įterpiami paruošti dvigrandžiai oligonukleotidai. Atliekamas DH5α E. coli transformacija. Užaugus kolonijoms atliekamas jų tikrinimas: šiuo atveju į PGR reakcijos mišinį dedamas tiesioginis U6 promotoriaus pradmuo (2.1 lentelė). PGR reakcijos mėginiai po amplifikacijos analizuojami 1 – 1.5 % agaroziniame gelyje. Pasirinktas kolonijas naudojame plazmidinės DNR išskyrimui.

2.2.1.13. RNR išskyrimas

RNR iš žinduolių ląstelių išskirta naudojant RNR skyrimo iš eukariotinių ląstelių rinkinius „Quick-RNA™ Miniprep Kit“ (Zymo Research).

RNR iš navikų ir sveikų audinių išskirta „mirVANA™ PARIS™ Protein and RNA Isolation System“ (Life Technologies).

2.2.1.14. Kopijinės DNR sintezė nuo RNR

Kopijinė DNR sintetinama naudojant „ReverstAid RT Kit“ rinkinį (*Thermo Fisher Scientific*), pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.2. Baltymų tyrimo metodai

2.2.2.1. Baltymų išskyrimas

Iš virškinamo trakto organų navikinių ir sveikų audinių baltymai išskirti naudojant mirVANA™PARIS™ Protein and RNA Isolation System (*Life Technologies*) rinkinį. Rinkinys naudotas pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.2.2. Baltymų koncentracijos nustatymas

Baltymų koncentracijos tirpaluose nustatomos naudojant *Bradford* metodu (Olson ir Markwell, 2007). Kalibracinei kreivei sudaryti paruošiami žinomos BSA koncentracijos (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1 mg/ml BSA) tirpalai. Vietoje BSA į kontrolinę reakciją dedamas vanduo. Į reakciją įdedamas 1 ml *Bradford* reagento, gerai išmaišoma, laikoma 5 min. ir matuojams kiekvieno mėginio šviesos sugertis 595 nm šviesos ilgio bangoje. Iš gautų duomenų sudaroma sugerties priklausomybė nuo baltymų koncentracijos vaidzuojanti kalibracinė kreivė. Išmatavus atitinkamai paruošto tiriamojo tirpalo sugertį, pagal sudarytą kalibracinę kreivę nustatoma baltymų koncentracija.

2.2.2.3. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje

Baltymų elektroforezė atliekama denatūracijos sąlygomis poliakrilamidiniame gelyje baltymų elektroforezės buferiniame tirpale esant 120 V įtampai. Poliakrilamidinis gelis sudarytas iš koncentruojančios (4 % poliakrilamido) ir frakcionuojančios (12 % poliakrilamido) dalių. Mėginys sumaišomas su $2 \times$ baltymų mėginių dažu, 5 min. denatūruojamas 100 °C temperatūroje ir pernešamas į poliakrilamidinį gelį. Po elektroforezės, *Western blot* imunohibridizacijos metodu atliekama baltymų analizė.

2.2.2.4. Baltymų analizė *Western blot* imunohibridizacijos metodu

Po elektroforezės baltymai pernešami iš poliakrilamidinio gelio ant nitroceliuliozinės membranos. Pernešimas vykdomas šaltame baltymų pernešimo buferiniame tirpale 1 val. leidžiant 2 mA srovę 1 cm² membranos ploto. Po baltymų pernešimo membrana 2 val. blokuojama blokavimo buferiniu tirpalu kambario temperatūroje, o po to 16 val. inkubuojama su pirminiais antikūnais 4 °C temperatūroje (pirminiai antikūnai skiedžiami pagal gamintojo rekomendacijas 1 × TBST buferiniame tirpale). Toliau membrana praplaunama du kartus po 10 min. 1 × TBST buferiniu tirpalu ir 2 val. inkubuojama su antriniais antikūnais kambario temperatūroje (antriniai antikūnai skiedžiami pagal gamintojo rekomendacijas 1 × TBST buferiniame tirpale). Po to membrana praplaunama du kartus po 10 min. 1 × TBST buferiniu tirpalu ir naudojant TMB reagentą vykdoma baltymų detekcija.

2.2.3. Eukariotinių ląstelių kultivavimas ir tyrimo metodai

2.2.3.1. Ląstelių linijų kultivavimas *in vitro*

A549, CaKi- 1, COLO 205, HeLa, HEK 293A, KATOIII, PANK-1, SU.86.86, T3M4, 786-O, ląstelės auginamos DMEM, o HCT116 ląstelės auginamos McCoy's 5A mitybinėje terpėje (sterilioje aplinkoje) pridėjus 10 % FBS, 2 mM glutamino ir 100 U penicilino ir 0,1 mg/ml streptomicino mišinio. Normaliomis sąlygomis ląstelių kultūra auginama reikiamos talpos auginimo induose CO₂ inkubatoriuje, esant 21 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C temperatūrai ir 95 % drėgmei, kol adhezinėmis ląstelėmis pasidengia apie 80–90 % auginimo indo paviršiaus ploto. Dalijant ląsteles pašalinama terpė, ląstelės praplaunamos kambario temperatūros 1 × PBS buferiniu tirpalu, pridėdama tripsino tirpalo ir 5 min. inkubuojama 37 °C temperatūroje. Ląstelėms atsikabinus nuo auginimo indo pagrindo, jos padalinamos santykiu 1:2–1:5 į naujus indus, pridėdama mitybinės terpės ir inkubuojama CO₂ inkubatoriuje iki kito dalijimo.

Kultivuojant ląsteles hipoksinėmis sąlygomis, iš pradžių jos auginamos normaliomis sąlygomis (21 % O₂), o kai pasiekia 80–90 % auginimo indo paviršiaus plotą, 16 val. įdedamos į hipoksijos kamerą, kurioje yra 1 % O₂. Taip ląstelės auginamos 24 h, tada surenkamos ir analizuojamos.

Dirbama steriliomis sąlygomis vertikalaus srauto laminare, naudojamose tik sterilios darbo priemonės.

2.2.3.2. Ląstelių šaldymas ir atšildymas

Nuo ląstelių kultūros pašalinama terpė, ląstelės praplaunamos kambario temperatūros $1 \times$ PBS buferiniu tirpalu, pridedama tripsino tirpalo ir 5 min. inkubuojama $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Nuo auginimo indo pagrindo atsikabinusios ląstelės surenkamos 5 min. centrifuguojant $1000 \times$ g greičiu. Supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos šaldymo terpėje (ląstelių koncentracija viename mililitre turi būti 10^6 – 10^7), išdalijamos į šaldymo ampules ir dedamos į specialią dėželę, kuri patalpinta į $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros šaldiklį atšąla $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ greičiu. Ilgai saugoti ląstelės perkeliama į skystą azotą.

Ląsteles atšildant, šaldymo ampulė 1 min. įdedama į $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūros vandens vonią, atšildoma, ir kaip galima greičiau ląstelės užsėjamos į reikiamos talpos sterilų auginimo indą su paruošta mitybine terpe. Auginama CO_2 inkubatoriuje esant 5% CO_2 , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūrai ir 95% drėgmei.

2.2.3.3. Ląstelių paruošimas skaičiavimui

Ląstelės auginamos kol pasiekia norimą konfluentiškumą. Nuo ląstelių kultūros pašalinama terpė, ląstelės praplaunamos kambario temperatūros $1 \times$ PBS buferiniu tirpalu, pridedama tripsino tirpalo ir 5 min. inkubuojama $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Nuo auginimo indo pagrindo atsikabinusios ląstelės surenkamos 5 min. centrifuguojant $1000 \times$ g greičiu. Ląstelės skaičiuojamos “Cedex” aparatu pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.3.4. DNR įterpimas į ląsteles transfekcijos metodu

Ląstelių transfekcijai naudojamas jetPRIME (Polyplus) transfekcijos reagentu. Ląstelių transfekcija atliekama 12 šulinėlių lėkštelėje. Vieno šulinėlio transfekcijai paruošiamas transfekcijos mišinys: $1\text{ }\mu\text{g}$ DNR resuspenduojama $75\text{ }\mu\text{l}$ jetPRIME buferio ir 10 s purtoma ir nusukama. Į mišinį pridedama $3\text{ }\mu\text{l}$ jetPRIME transfekcijos reagento, vorteksuojama, nusukama ir 10 min inkubuojama kambario temperatūroje. Po inkubacijos mišinys sulašinamas į tuščią šulinėlį lėkštelėje. Į šulinėlį užnešama 1 ml transfekuojamų ląstelių suspensijos (80000 ląste/ 1 ml). Ląstelės suspenduojamos pilnos sudėties ląstelių auginimo terpėje. Ląstelės inkubuojamos $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje esant 5% CO_2 koncentracijai. Minimalus inkubavimo laikas – 24 h.

2.2.3.5. Baltymų raiškos redagavimas panaudojant CRISPR/Cas9 metoda

Specifinių genų redagavimui sukonstruoti CRISPR/Cas9-gRNR ir kontrolinis CRISPR/Cas9 raiškos vektoriai transfekcijos būdu įvedami į HCT 116 ląsteles. Po transfekcijos praėjus 48 h, nupilama ląstelių auginimo terpė ir užpilama nauja pilnos sudėties auginimo terpė, kurios sudėtyje yra 2 µg/ml puomicino. Ląstelės dar 72 h grąžinamos į inkubatorių. Po inkubacijos ląstelės praplaunamos 37 °C temperatūroje 1 x PBS tirpalu, surenkamos, skiedžiamos standartine pilnos sudėties auginimo terpe ir išpilstomos į 96 šulinėlių lėkštelę. Kitą dieną lėkštelė tikrinama ir atrenkami tik tie šulinėliai, kuriuose yra išsėta po 1 ląstelę. Ląstelės auginamos tol, kol suformuoja kolonijas. Kolonijos dalinamos ir toliau kultivuojamos. Iš atskirų ląstelių kolonijų paruošiami baltymų lizatai. Atitinkamų baltymų raiška tikrinama *Western Blot* baltymų imunodetekcijos metodu.

2.2.3.6. Ląstelių branduolių ekstraktų paruošimas

Ląstelių branduolių ekstraktai ruošiami naudojant „NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ (Thermo Fisher Scientific) rinkinį, darbą atliekant pagal gamintojo rekomendacijas.

3. REZULTATAI

3.1. Mokslinio darbo apibūdinimas

Pre-iRNR splaisingas yra labai svarbus genų raišką reguliuojantis procesas, todėl nieko keisto, kad splaisingo pokyčiai nustatyti daugelio įvairių ligų, ypač onkologinių, atvejais. Patologinį procesą slopinančių ir jį skatinančių iRNR izoformų raiškos balansas yra esminis ligų raidos aspektas. Rengiant šį darbą, sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose bei ląstelių linijose atliktas splaisingą reguliuojančių veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos tyrimas. Taip pat tyrinėta, ar (kaip) hipoksinė mikroaplinka ląstelėse veikia su onkologinėmis ligomis siejamus pre-iRNR splaisingo pokyčius. Ištyrus splaisingo veiksnių ir su vėžiu siejamų iRNR izoformų raišką, atliktas sveikų ir navikinių virškinimo trakto audinių biopsijos mėginių bei ląstelių linijų palyginimas. Gauti duomenys leidžia apibūdinti splaisingo veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR raišką ląstelių linijose ir suteikė naujų žinių apie ląstelių linijų, kaip naviko modelinės sistemos, savybes. Normaliomis ir hipoksijos sąlygomis atlikti su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos tyrimai parodė, kad besikeičianti ląstelių mikroaplinka yra svarbus pre-iRNR splaisingą keičiantis veiksnys. Tyrimo metu skirtinguose auglių tipuose nustatyta jiems būdinga skirtingų splaisingo veiksnių raiška, todėl šie veiksniai gali būti naudojami kaip potencialūs vėžio žymenys.

3.2. Splaisingo veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos virškinimo trakto augliuose ir vėžinėse ląstelių linijose lyginamoji analizė

Sukaupti eksperimentiniai duomenys liudija, kad splaisingo veiksnių raiškos pasikeitimai yra viena iš priežasčių, lemiančių su onkologinėmis ligomis siejamų pre-iRNR splaisingo pokyčius (Anczukow ir Krainer, 2016). Įvairios vėžinės ląstelių linijos yra dažniausiai naudojama modelinė sistema, kurioje atliekami onkologinių ligų tyrimai. Deja, vėžinėse ląstelių linijose sėkmingai atlikti naujų antivėžinių vaistų ir gydymo strategijų bandymai kituose tyrimų etapuose (pavyzdžiui, 3D ląstelių sistemose ar tyrimams naudojant peles) dažnai nepasitvirtina (Arrowsmith, 2011). Tai leidžia patvirtinti įžvalgą, kad vėžinės ląstelių linijos skiriasi tiek nuo sveikų, tiek

nuo navikinių audinių. Deja, duomenų, kurie leistų tiksliai apibrėžti šiuos skirtumus, kol kas labai trūksta. Todėl gyvybiškai svarbu navikiniuose audiniuose ir dažniausiai naudojamose ląstelių linijose nustatyti tiriamų baltymų raiškos ar su vėžinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos pokyčius. Tik įvertinus, kaip skirtingose sistemose vyksta šie patologijas sukeltys procesai, ląstelių modelinėse sistemose bus galima sukurti sąlygas, maksimaliai atitinkančias auglių mikroaplinką. Tinkamai parinkta pradinių tyrimų modelinė sistema yra sėkmingų naujų antivėžinių terapijų pagrindas.

Literatūros šaltiniuose teigiama, kad splaisingo veiksnių raiška augliuose kinta (Anczukow ir Krainer, 2016). Šioje tiriamojo darbo dalyje lyginama splaisingo veiksnių U2AF35, U2AF65, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP baltymų raiška virškinimo trakto augliuose ir vėžinėse ląstelių linijose. Taip pat buvo tiriama su onkologiniais procesais siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška. Šie genai pasirinkti dėl specifinių navikams būdingų splaisingo metu susidarantių iRNR izoformų, nuo kurių sintetunami baltymai didina navikinių ląstelių atsparumą apoptozei, citoskeleto persitvarkymus, migraciją ir proliferaciją.

3.2.1. Splaisingo veiksnių raiška navikiniuose gaubtinės žarnos, skrandžio ir kasos audiniuose

Tyrimo tikslams pasiekti buvo išanalizuoti 29 sveikų asmenų ir 40 onkologinėmis ligomis sergančių pacientų biopsijos audinių pavyzdžiai (7 lentelė). *Western blot* (WB) baltymų hibridizacijos metodu ištyrus gautus mėginius nustatyta pasirinktų splaisingo veiksnių baltymų raiška sveikuose ir navikiniuose audiniuose (8 lentelė).

Iki $1,6 \pm 0,1$ ir $1,4 \pm 0,2$ karto sumažėjusi splaisingo veiksnio SRSF1 raiška, lyginant su sveikais audiniais, nustatyta skrandžio ir gaubtinės žarnos navikų audiniuose. O kasos navikų audiniuose nustatyta gerokai, net iki $13,5 \pm 0,3$ karto, sumažėjusi šio splaisingo veiksnio raiška. Kasos ir gaubtinės žarnos navikiniuose audiniuose, lyginant su sveikais audiniais, nustatyta atitinkamai $1,4 \pm 0,4$ ir $1,3 \pm 0,2$ karto mažesnė splaisingo veiksnio KHSRP baltymo raiška. Iki $1,4 \pm 0,4$ karto sumažėjo KHSRP baltymo raiška ir gerokai (iki 7 kartų) padidėjo SRSF2 baltymo raiška skrandžio navikų audiniuose. Kasos ir gaubtinės žarnos navikiniuose audiniuose splaisingo veiksnio SRSF2 raiškos pokytis nenustatytas.

7 lentelė. Lyginamojoje analizėje naudoti audiniai

Organas	Sveikas	Navikinis
<i>Kasa</i>	8	12
<i>Skrandis</i>	15	14
<i>Gaubtinė žarna</i>	6	14
Iš viso:	29	40

8 lentelė. Splaisingo veiksnių raiška sveikuose ir navikiniuose kepenų, gaubtinės žarnos ir kasos audiniuose

Organas	Splaisingo veiksniai				
	SFRS2	SFRS1	U2AF35	U2AF65	KHSRP
<i>Kasa</i>	-1,1±0,4	-13,5±0,3	-3,6±0,3	+2,1±0,3	-1,4±0,4
<i>Gaubtinė žarna</i>	-1,1±0,3	-1,4±0,2	-3,2±0,1	-1,3±0,4	-1,3±0,2
<i>Skrandis</i>	-7,0±0,3	-1,6±0,1	+2,3±0,5	-1,9±0,3	-1,4±0,4

Sumažėjusi (-) arba padidėjusi (+) splaisingo veiksnių raiška, kai sveikuose audiniuose to paties splaisingo veiksnio raiška prilyginama 1.

Darbe taip pat analizuota splaisingo veiksnį U2AF sudarančių subvienetų U2AF65 bei U2AF35 raiška – tarpusavyje palyginta šių baltymų raiška sveikų ir navikinių audinių biopsijos mėginiuose. Paaiškėjo, kad skirtingų virškinimo trakto organų navikų audiniuose U2AF veiksnį sudarančių subvienetų raiška skiriasi. Kasos navikų audiniuose nustatyta 2 kartus didesnė (2,1±0,3) 65 kDa subvieneto raiška. Skrandžio navikų mėginiuose šio splaisingo veiksnio raiška buvo sumažėjusi beveik 2 kartus (1,9±0,3). Gaubtinės žarnos navikų audiniuose splaisingo veiksnio U2AF65 baltymo raiška sumažėjo iki 1,3±0,4 karto. 3 kartus mažesnė splaisingo veiksnio U2AF35 baltymo raiška nustatyta kasos ir gaubtinės žarnos auglių mėginiuose. Iki 2,3±0,5 karto padidėjusi šio subvieneto raiška nustatyta skrandžio navikų mėginiuose.

Šiame tiriamojo darbo etape gauti duomenys leidžia patvirtinti, kad splaisingo procesą ląstelėse reguliuojančių veiksnių raiška skirtinguose sveikuose ir navikiniuose audiniuose skiriasi.

3.2.2. Splaisingo veiksnių raiška virškinimo trakto ir inkstų ląstelių linijose

Kitame virškinimo trakto auglių ir ląstelių linijų lyginamosios analizės etape buvo tiriamos įvairios virškinimo trakto (gaubtinės žarnos, skrandžio, kasos) ir inkstų ląstelių linijos. *Western blot* baltymų hibridizacijos metodu buvo analizuojami paruošti ląstelių lizatai. Juose tirta U2AF35, U2AF65, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP baltymų raiška. Anksčiau atlikto tyrimo metu buvo nustatyta, kad splaisingo veiksnių raiška skirtingo tipo navikų

audiniuose kinta. Kilo klausimas, ar tokie patys splaisingo veiksmų raiškos pokyčiai būdingi ir vėžinėms ląstelių linijoms. Taip pat buvo siekiama išsiaiškinti, kokia splaisingo veiksmų raiška vyrauja iš to paties organo kilusiose skirtingose ląstelių linijose. Norint išsamiai atsakyti į šiuos klausimus, tyrimams pasirinktos trys kasos karcinomos (PANC-1, SU.86.86 ir T3M4), dvi inkstų adenokarcinomos (Caki-1 ir 786-O), skrandžio karcinomos KATO III ir gaubtinės žarnos karcinomos HCT116 ląstelės. Palyginimui kaip nevėžinė ląstelių linija buvo pasirinktos žmogaus embrioninės inkstų HEK 293A ląstelės. Tiriant iš skirtingų ląstelių linijų paruoštus lizatus, nustatyti splaisingo veiksmų raiškos svyravimai (9 lentelė).

Tyrimo metu nustatyta, kad, palyginti su kontroline HEK 293A ląstelių linija, splaisingo veiksmo U2AF atskirų subvienetų raiška skirtingose ląstelių linijose sumažėjo ne daugiau nei 2 kartus. Mažiausi splaisingo veiksmo U2AF65 raiškos pokyčiai nustatyti KATO III ir HCT116 ląstelėse – jose šio splaisingo veiksmo raiška sumažėjo atitinkamai 1,2±0,1 ir 1,3±0,1 karto. Kitose tirtose ląstelių linijose taip pat nustatyta sumažėjusi splaisingo veiksmo U2AF65 raiška. Inkstų Caki-1 ir 786-O ląstelėse splaisingo veiksmo U2AF65 raiška sumažėjo atitinkamai 1,6±0,1 ir 1,6±0,2 karto. Splaisingo veiksmo U2AF65 baltymo raiška kasos T3M4 ląstelėse sumažėjo 1,4±0,0 karto, SU.86.86 – 1,5±0,1 karto ir PANC-1 – daugiausia, 1,7±0,0 karto. Splaisingo veiksmo U2AF35 baltymo raiška kasos karcinomos SU.86.86 ir T3M4 ląstelių linijose kito mažiausiai – sumažėjo atitinkamai 1,2±0,1 ir 1,3±0,1 karto. Visose kitose tirtose ląstelių linijose nustatyta 1,4–1,8 karto sumažėjusi splaisingo veiksmo U2AF35 raiška. Nors kasos ir skrandžio vėžiniuose audiniuose nustatyta padidėjusi atskirų splaisingo veiksmų U2AF sudarančių subvienetų raiška, tačiau ji nebuvo padidėjusi nė vienoje kasos ir skrandžio ląstelių linijoje. Gauti rezultatai rodo, kad

9 lentelė. Splaisingo veiksmų raiška vėžinėse ląstelių linijose

Organas	Ląstelių linija	Splaisingo veiksniai				
		SFRS2	SFRS1	U2AF35	U2AF65	KHSRP
<i>Kasa</i>	PANC-1	-2,1±0,1	-1,4±0,1	-1,5±0,0	-1,7±0,0	-1,5±0,3
	SU.86.86	-1,7±0,1	-1,7±0,3	-1,2±0,1	-1,5±0,1	-1,4±0,1
	T3M4	-1,6±0,0	-1,8±0,2	-1,3±0,1	-1,4±0,0	-1,5±0,1
<i>Inkstai</i>	CaKi-1	-1,5±0,2	-1,1±0,2	-1,7±0,2	-1,6±0,1	-1,4±0,1
	786-O	-1,3±0,1	-1,3±0,3	-1,8±0,0	-1,6±0,2	-1,3±0,1
<i>Gaubtinė žarna</i>	HCT116	-2,6±0,0	-1,5±0,2	-1,4±0,0	-1,3±0,1	-1,4±0,1
<i>Skrandis</i>	KATO III	-1,4±0,3	-1,2±0,1	-1,6±0,0	-1,2±0,1	-1,1±0,3

Sumažėjusi (-) arba padidėjusi (+) splaisingo veiksmų raiška, kai HEK 293A ląstelėse to paties splaisingo veiksmo raiška prilyginama 1.

splaisingo veiksmių U2AF65 ir U2AF35 raiška navikiniuose audiniuose ir iš navikų kilusiose ląstelių linijose yra skirtinga

Atliekant KHSRP baltymo raiškos analizę, KATO III ląstelėse jokių pokyčių nenustatyta. Kitose tirtose ląstelių linijose jo raiška buvo sumažėjusi 1,3–1,5 karto. Šiuo atveju ląstelių linijose nustatyti KHSRP baltymo raiškos pokyčiai atitinka vėžinių audinių tyrimo rezultatus.

Visose minėtose ląstelių linijose ištirta ir SR baltymų SRSF1 bei SRSF2 raiška. Lyginant šių splaisingo veiksmių raišką su inkstų embrioninėse kamieninėse HEK 293A ląstelėse nustatyta tų pačių splaisingo veiksmių raiška, visose tirtose ląstelių linijose nustatytas SRSF2 baltymo raiškos sumažėjimas. Iki $1,3 \pm 0,1$ karto SRSF2 raiška sumažėjo 786-O ląstelėse, o daugiausia – net $2,6 \pm 0,1$ karto – sumažėjo gaubtinės žarnos HCT116 ląstelių linijoje. Kitose tirtose ląstelių linijose SRSF2 baltymo raiškos sumažėjimas svyravo nuo 1,4 iki 2,1 karto. Splaisingo veiksmio SRSF1 raiška, palyginti su kontrolinėmis HEK 293A ląstelėmis, nesikeitė Caki-1 ląstelių linijoje. KATO III ir 789-O ląstelių linijose šio SRSF1 baltymo raiška sumažėjo atitinkamai $1,2 \pm 0,1$ ir $1,3 \pm 0,3$ karto. Visose kitose tirtose ląstelių linijose nustatytas nuo 1,4 iki 1,8 karto svyruojantis splaisingo veiksmio SRSF1 baltymo raiškos sumažėjimas. Nors visose tirtose ląstelių linijose splaisingo veiksmių SRSF1 ir SRSF2 raiška mažėjo, tačiau ne tiek daug kaip kasos ir skrandžio vėžiniuose audiniuose. Tyrimo duomenys rodo, kad splaisingo veiksmių SRSF1 ir SRSF2 raiška navikų audiniuose ir vėžinėse ląstelių linijose yra skirtinga.

Analizuojant iš skirtingų organų navikų kilusias ląstelių linijas labiausiai pasikeitė splaisingo veiksmio SRSF2 raiška: HCT116 ir PANK-1 ląstelėse, palyginti su kontroline HEK 293A linija, ji sumažėjo daugiau nei 2 kartus. Splaisingo veiksmių U2AF sudarančių 65 kDa ir 35 kDa subvienetų raiškos analizė parodė, kad šių baltymų raiška tirtose ląstelių linijose mažėja: U2AF65 atveju – iki 1,7, o U2AF35 atveju – iki 1,8 karto. Splaisingo veiksmių raiškos pokyčiai nenustatyti tarpusavyje lyginant karcinomos (PANK-1, CaKi-1, 786-O) ir naviko metastazių (SU.86.86, T3M4, KATO III) ląstelių linijas.

Tyrimas parodė, kad analizuoti pasirinktų splaisingo veiksmių raiškos pokyčiai iš organų navikų išvestose ląstelių linijose neatitinka navikų audiniuose nustatytos tų pačių splaisingo veiksmių raiškos.

3.2.3. Su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška navikiniuose gaubtinės žarnos, skrandžio ir kasos audiniuose

Navikų ląstelėse atlikus RNR raiškos tyrimus, nustatyta daugybė alternatyviojo splaisingo pakitimų, kurie lemia specifinių, su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raišką (Wang ir Lee, 2018). Dažniausiai pakitusi splaisingo veiksmų raiška ar aktyvumas lemia su vėžine ląstelių transformacija susijusius pre-iRNR splaisingo pokyčius (Coltri, Dos Santos et al., 2019). Šiame darbe atlikta tam tikrų splaisingo veiksmų raiškos navikiniuose audiniuose lyginamoji analizė atskleidė splaisingo veiksmų raiškos pokyčius ir aiškiai parodė, kad šių splaisingo veiksmų raiška skirtingų organų navikuose skiriasi. Kilo klausimas: ar splaisingo veiksmų raiškos pokyčiai navikiniuose audiniuose lemia su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raišką? Fas ir Rac1 genai eksperimentui pasirinkti dėl specifinių navikams būdingų alternatyviojo splaisingo metu susidarantių sFas bei Rac1b iRNR, nuo kurių sintetinami baltymai didina navikinių ląstelių atsparumą apoptozei, citoskeleto persitvarkymus, migraciją ir proliferaciją (Izquierdo, Majos et al., 2005, De, Aske et al., 2019). Darbe navikiniuose gaubtinės žarnos, skrandžio ir kasos audiniuose analizuota nuo protoonkogenų Fas ir Rac1 iRNR susidarantių izoformų raiška (10 ir 11 lentelės). Iš auglių biopsijos mėginių išskirta RNR panaudota cDNR sintezei. Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška analizuota PGR metodu kiekvienai individualiai iRNR izoformai panaudojus specifines pradmenų poras.

Atliekant tyrimą, kasos navikų audiniuose nustatyta 1,5 karto didesnė sFas iRNR raiška nei sveikuose kasos audiniuose (sFas/Fas: sveikuose audiniuose 0,2/0,8; navikų audiniuose 0,3/0,7). Tuose pačiuose auglių mėginiuose Rac1 ir Rac1b izoformų raiška liko nepakitusi (Rac1b/Rac: sveikuose audiniuose 0,2/0,8; navikų audiniuose 0,2/0,8). Skrandžio navikų audiniuose, lyginant su sveikais audiniais, sFas iRNR raiškos pokyčių nenustatyta (sFas/Fas: sveikuose audiniuose 0,25/0,75; navikų audiniuose 0,3/0,7), tačiau nustatytas didesnis – 2 kartus siekiantis – Rac1b iRNR izoformos raiškos padidėjimas (Rac1b/Rac1: sveikuose audiniuose 0,1/0,9; navikų audiniuose 0,2/0,8). Gaubtinės žarnos navikų audiniuose, lyginant su sveikais audiniais, nustatyta 3 kartus didesnė sFas iRNR izoformos (sFas/Fas: sveikuose audiniuose 0,1/0,9; navikų audiniuose 0,3/0,7) ir 2 kartus didesnė Rac1b iRNR izoformos (Rac1b/Rac1: sveikuose audiniuose 0,1/0,9; navikų audiniuose 0,2/0,8) raiška.

10 lentelė. Fas iRNR izoformų raiška sveikuose ir navikiniuose kasos, storosios žarnos ir skrandžio audiniuose

Organas	Genas			
	<i>Fas</i>			
	Fas iRNR		sFas iRNR	
	<i>Sveikas</i>	<i>Navikinis</i>	<i>Sveikas</i>	<i>Navikinis</i>
<i>Kasa</i>	0,8±0,04	0,7±0,03	0,2±0,04	0,3±0,03
<i>Gaubtinė žarna</i>	0,9±0,07	0,7±0,06	0,1±0,07	0,3±0,06
<i>Skrandis</i>	0,7±0,04	0,7±0,03	0,3±0,04	0,3±0,03

Skaičiuojant abiejų iRNR izoformų (Fas ir sFas) raiška prilyginama 1.

11 lentelė. Rac1 iRNR izoformų raiška sveikuose ir navikiniuose kasos, storosios žarnos ir skrandžio audiniuose

Organas	Genas			
	<i>Rac1</i>			
	Rac1 iRNR		Rac1b iRNR	
	<i>Sveikas</i>	<i>Navikinis</i>	<i>Sveikas</i>	<i>Navikinis</i>
<i>Kasa</i>	0,8±0,08	0,8±0,04	0,2±0,08	0,2±0,04
<i>Gaubtinė žarna</i>	0,9±0,03	0,8±0,06	0,1±0,03	0,2±0,06
<i>Skrandis</i>	0,9±0,05	0,8±0,05	0,1±0,05	0,2±0,04

Skaičiuojant abiejų iRNR izoformų (Rac1 ir Rac1b) raiška prilyginama 1.

Visuose tirtų navikų audiniuose, lyginant su sveikais audiniais, nustatytas padidėjęs su onkologinėmis ligomis siejamų sFas ir Rac1b iRNR izoformų susidarymas. Išimtis šiuo atveju yra Rac1b ir Rac1 iRNR izoformų raiška kasos bei sFas ir Fas iRNR izoformų raiška skrandžio navikuose, kuriuose, palyginti su sveikais audiniais, izoformų raiškos santykis nesikeičia. Šio tyrimo metu didžiausias su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos santykio pokytis nustatytas gaubtinės žarnos navikų audiniuose.

3.2.4. Su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška virškinimo trakto ir inkstų ląstelių linijose

Ląstelių linijos, kaip modelinė sistema, dažnai naudojamos įvairių onkologinių procesų tyrimams, pavyzdžiui, su onkologinėmis ligomis siejamų baltymų ar iRNR izoformų analizei. Šiame darbe atlikti tyrimai parodė, kad splaisingo veiksnių raiška augliuose ir iš jų kilusiose ląstelių linijose skiriasi. Šiame darbų etape buvo tiriama, kokia Fas ir Rac1 iRNR sintezė būdinga ląstelių linijose. Taip pat nebuvo žinoma, kokia Fas ir Rac1

iRNR izoformų raiška būdinga iš to paties organo kilusiose skirtingose vėžinėse ląstelių linijose.

Norint skirtingose ląstelių linijose nustatyti Fas ir Rac1 iRNR raišką, tyrimams panaudota iš skirtingų ląstelių linijų išskirta visuminė RNR. RT-PGR reakcijai buvo panaudoti Rac1 ir Rac1b bei Fas ir sFas iRNR specifiniai pradmenys. Gauti rezultatai atskleidė vėžinėms ląstelių linijoms būdingą Fas ir Rac1 iRNR izoformų raišką (12 lentelės).

12 lentelė. Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška virškinimo trakto ir inkstų vėžinėse ląstelių linijose

Organas	Ląstelių linija	Genas			
		Fas		Rac1	
		Fas iRNR	sFas iRNR	Rac1 iRNR	Rac1b iRNR
<i>Kasa</i>	PANC-1	0,9±0,08	0,1±0,08	0,8±0,07	0,2±0,07
	SU8686	0,9±0,10	0,1±0,10	0,9±0,04	0,1±0,04
	T3M4	0,9±0,08	0,1±0,08	0,9±0,05	0,1±0,05
	Capan-1	0,8±0,08	0,2±0,08	0,9±0,02	0,1±0,02
<i>Embriono inkstai</i>	HEK 293A	0,7±0,08	0,3±0,08	0,8±0,02	0,2±0,02
<i>Inkstai</i>	786-O	0,6±0,06	0,4±0,06	0,9±0,02	0,1±0,02
	CaKi-1	0,8±0,08	0,2±0,08	0,9±0,01	0,1±0,01
<i>Skrandis</i>	KATO III	0,8±0,05	0,2±0,05	0,9±0,03	0,1±0,03
<i>Gaubtinė žarna</i>	HCT116	0,7±0,05	0,3±0,05	0,9±0,03	0,1±0,03

Skaičiuojant abiejų iRNR izoformų (Fas ir sFas, Rac1 ir Rac1b) raiška prilyginama 1.

Tyrimo metu mažiausia (sFas/Fas: 0,1/0,9) sFas iRNR izoformos raiška nustatyta kasos PANK-1, SU.86.86 ir T3M4 ląstelių linijose. Šiuo atveju iš visų vėžinių kasos ląstelių linijų labiausiai išsiskyrė Capan-1 ląstelių linija, kurioje nustatyta kiek didesnė (sFas/Fas: 0,2/0,8) sFas iRNR raiška. Didžiausi sFas iRNR izoformos raiškos pokyčiai nustatyti 786-O ir HCT116 ląstelių linijose (atitinkamai sFas/Fas: 0,4/0,6, sFas/Fas: 0,3/0,7). HEK 293A ląstelėse, kurios šiame darbe analizuotos kaip nevėžinės kilmės kontrolinė ląstelių linija, nustatytas 30 % sFas iRNR izoformos raiškos padidėjimas (sFas/Fas: 0,3/0,7).

Atlikus Rac1 iRNR izoformų raiškos ląstelių linijose analizę paaiškėjo, kad didžiausia Rac1b iRNR izoformos raiška buvo PANK-1 ir HEK 293A ląstelėse (Rac1b/Rac1: 0,2/0,8). Kitose ląstelių linijose nustatyta 10 % neviršijanti Rac1b iRNR izoformos raiška (Rac1b/Rac1: 0,1/0,9).

Apibendrinant gautus rezultatus, galima drąsiai teigti, kad monosluoksiu kultivuotose vėžinėse ląstelių linijose ir augliuose su onkologinėmis ligomis siejamų sFas/Fas ir Rac1b/Rac1 iRNR izoformų raiškos santykis yra

skirtingas. Vėžinėse ląstelių linijose nustatyta su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 iRNR raiška yra panašesnė į sveikų audinių, o ne į vėžiniuose audiniuose nustatytą iRNR raišką. Išimtis yra tik gaubtinės žarnos karcinomos HCT116 ląstelių linija, kurioje nustatyta sFas iRNR raiška atitinka gaubtinės žarnos navikų audiniuose gautus rezultatus. Taip pat šis tyrimas parodė, kad analizuotų sFas ir Rac1b iRNR izoformų raiška HEK 293A ląstelėse labiau primena ne sveikuose, o navikiniuose audiniuose nustatytą tų pačių iRNR raišką.

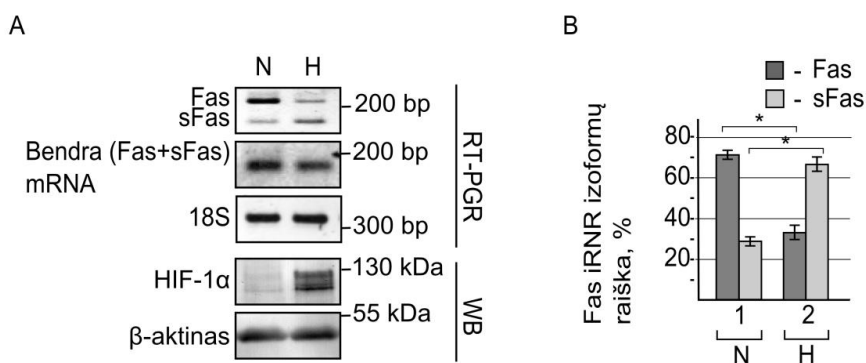
3.3. Hipoksija keičia Fas pre-mRNA alternatyvųjį splaisingą

Hipoksija yra daugelio auglių mikroaplinkos dalis (Evans ir Koch, 2003). Literatūros šaltiniuose teigiama, kad hipoksiniai augliai sunkiai pasiduoda radioterapijam bei chemoterapijam gydymui (Brown, 1999). Pre-iRNR splaisingo pokyčiai yra vienas mechanizmų, dėl kurio vėžinės ląstelės prisitaiko prie hipoksinės mikroaplinkos. Pavyzdžiui, žmogaus krūties vėžinėse ląstelių linijose atliekant RNR sekoskaitos tyrimus nustatyti net 3689 hipoksijos indukuojami alternatyviojo splaisingo atvejai (Han, Li et al., 2017). Šis ir kiti panašūs tyrimai rodo, kad hipoksiam aplinkos poveikiui jautrus pre-iRNR splaisingo mechanizmas ląstelėse veikia kaip svarbus šių ląstelių išgyvenamumą skatinantis veiksnys (Bowler, Porazinski et al., 2018).

Darbe atlikti tyrimai parodė, kad normaliomis aplinkos sąlygomis augintose ląstelių linijose nustatyta alternatyviojo splaisingo metu nuo pre-iRNR susidarančių Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška neatitinka šių genų raiškos, nustatytos auglių audinių mėginiuose. Atliekant anksčiau aprašytus tyrimus nebuvo įvertintas galimas hipoksijos, kaip auglio mikroaplinkos, poveikis. Iškelta hipotezė, jog minėti neatitikimai tarp navikų ir vėžinių ląstelių linijų nustatyti todėl, kad ląstelių linijose nebuvo augliams būdingos hipoksinės mikroaplinkos. Siekiant patikrinti išsikeltą hipotezę, šiame eksperimentinio tyrimo etape buvo analizuojamas hipoksijos poveikis su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 genų alternatyviojo pre-iRNR splaisingo procesui.

3.3.1. Hipoksija HCT116 ląstelėse inicijuoja Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo pokyčius

Pakitus Fas pre-iRNR splaisingui, nuo susidariusios sFas iRNR sintetinamas tirpus sFas baltymas naviko ląstelėms neperduoda apoptozinio signalo ir ląstelės išgyvena. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad hipoksinė mikroaplinka ląstelėse inicijuoja ne tik genų raiškos, bet ir pre-iRNR splaisingo pokyčius (Kanopka, 2017). Kilo klausimas: ar hipoksija, kaip ląstelių aplinkos veiksnys, gali keisti su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raišką? Kadangi padidėjusi tirpaus sFas baltymo raiška nustatyta gaubtinės žarnos karcinoma sergančių pacientų kraujo serumuose (Midis, Shen et al., 1996), Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo metu susidaranti Fas ir sFas baltymus koduojanti iRNR izoformų tyrimams atlikti buvo pasirinkta gaubtinės žarnos HCT116 ląstelių linija. Iš normaliomis deguonies ir hipoksijos sąlygomis augintų ląstelių išskirta RNR panaudota RT-PGR analizei. Iš tų pačių ląstelių paruošti ląstelių lizatai analizuoti *Western blot* hibridizacijos metodu. HIF-1 α baltymas šiuo atveju naudojamas kaip hipoksinės aplinkos sąlygų žymuo. Normaliomis deguonies sąlygomis augintose ląstelėse nustatyta didesnė Fas ir mažesnė sFas iRNR izoformų raiška (16 pav., A ir B, 1 takelis). Hipoksinėmis aplinkos sąlygomis augintose ląstelėse užfiksuoti alternatyviojo splaisingo metu susidaranti



16 pav. Nuo hipoksijos priklausomas Fas pre-iRNR alternatyvusis splaisingas HCT116 ląstelėse. A – normaliomis (21 % O₂) (N) ir hipoksinėmis (1 % O₂) (H) aplinkos sąlygomis augintose HCT116 ląstelėse susidaranti Fas ir sFas iRNR izoformų ir bendra (Fas+sFas) iRNR raiška. HIF-1 α naudojamas kaip hipoksinės aplinkos sąlygas parodantis žymuo, β -aktinas naudojamas kaip baltymų kiekio kontrolinis mėginys. B – Fas ir sFas iRNR izoformų raiškos pokytis (%) normaliomis deguonies (Nr. 1) ir hipoksijos (Nr. 2) sąlygomis augintose HCT116 ląstelėse. Skirtingų iRNR izoformų raiškos diagramos sudarytos naudojant 5 nepriklausomų eksperimentų duomenis, *p < 0,05

Fas iRNR izoformų santykio pasikeitimai. Šiuo atveju nustatyta didesnė sFas ir mažesnė Fas iRNR izoformos raiška (16 pav., A ir B, 2 takelis).

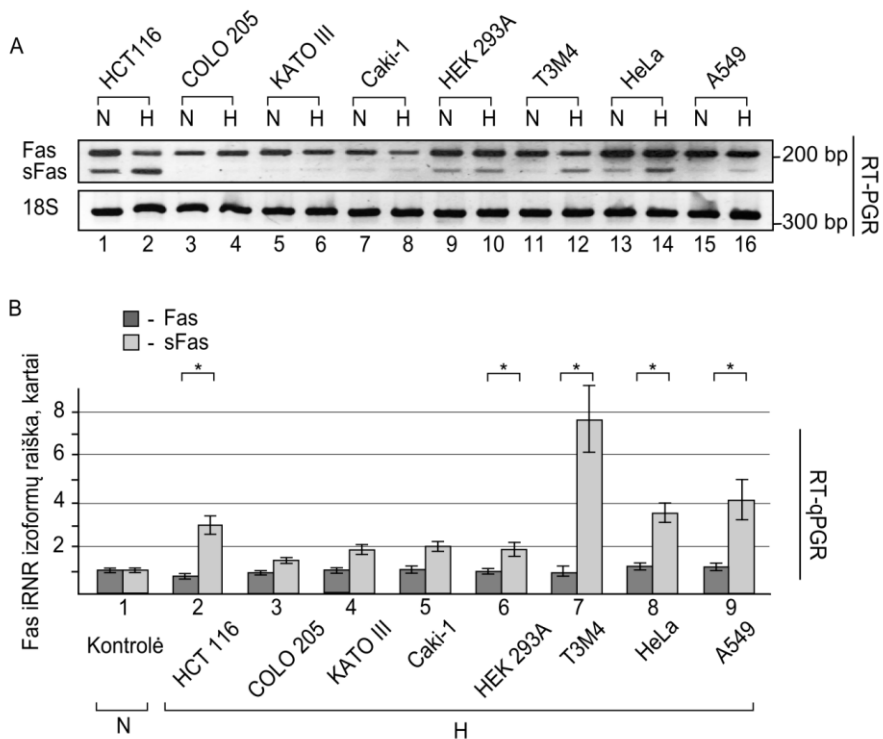
Šis tyrimas labai aiškiai parodė, kad hipoksija yra tas veiksnys, kuris HCT116 ląstelėse keičia Fas pre-iRNR alternatyvųjį splaisingą ir didina sFas iRNR izoformos raišką.

3.3.2. Hipoksija skirtingose ląstelių linijose keičia Fas pre-iRNR alternatyvųjį splaisingą

Skirtingose ląstelių linijose atlikti alternatyvių Fas iRNR izoformų raiškos tyrimai parodė, kad skirtingose ląstelių linijose šių iRNR izoformų raiška skiriasi. Normaliomis deguonies ir hipoksijos sąlygomis augintoje HCT116 ląstelių linijoje nustatyti Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo metu susidarančių izoformų pokyčiai privertė susimąstyti: ar šie hipoksijos inicijuoti alternatyviojo splaisingo pasikeitimai būdingi ir kitoms ląstelių linijoms? O gal dėl hipoksijos sFas iRNR izoformos raiška padidėja ir Fas iRNR izoformos raiška sumažėja tik HCT116 ląstelėse?

Norint atsakyti į šiuos klausimus, eksperimentui ląstelių linijos pasirinktos taip, kad kiekviena jų būtų kilusi iš skirtingo organo naviko ląstelių. Buvo naudojamos gaubtinės žarnos (COLO 205), skrandžio (KATO III), inkstų (Caki-1), kasos (T3M4), plaučių (A549) adenokarcinomos, embrioninės inkstų (HEK 293A) ir gimdos kaklelio vėžio (HeLa) ląstelių linijos. Normaliomis deguonies ir hipoksijos sąlygomis augintose ląstelių linijose RT-PGR metodu nustatyti alternatyvių Fas iRNR izoformų raiškos pokyčiai. Aiškus sFas iRNR izoformos raiškos padidėjimas, lyginant su normaliomis deguonies sąlygomis augintomis ląstelėmis, nustatytas hipoksijos sąlygomis augintose HEK 293A, T3M4, HeLa ir A549 ląstelių linijose (17 pav., A, 1, 2 ir 9–16 takeliai).

Kitose ląstelių linijose bendros Fas iRNR izoformų raiškos pasirinktu tyrimo metodu dėl nepakankamo tyrimo jautrumo tinkamai ištirti nepavyko. Tikslėnei Fas iRNR izoformų raiškos analizei buvo pasirinktas papildomas kiekybinis realiojo laiko PGR (RT-qPGR) metodas. Atskirų Fas iRNR izoformų nustatymui buvo sukonstruotos kiekvieną izoformą individualiai amplifikuojančios pradmenų poros (3 lentelė). RT-qPGR tyrimo metodas leido patvirtinti anksčiau gautus rezultatus ir parodė, kad visose tirtose ląstelių linijose, augintose hipoksinėmis aplinkos sąlygomis, sFas iRNR izoformos raiška padidėjo (17 pav., B). Žymus sFas iRNR raiškos padidėjimas nustatytas HCT116 (3 kartus), T3M4 (7,7 karto), HeLa (3,6 karto) ir A549 (4,4 karto) ląstelėse (17 pav., B, 2, 12, 14 ir 16 stulpeliai).

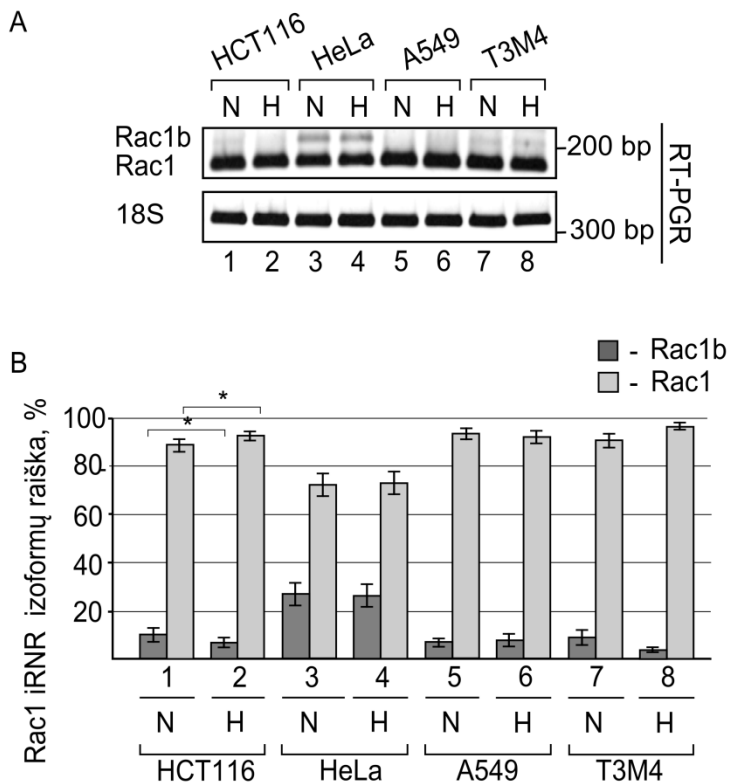


17 pav. Hipoksija įvairiose ląstelių linijose keičia Fas pre-iRNA alternatyvų splaisingą. *A* – normaliomis (N) ir hipoksinėmis (1 % O₂) (H) aplinkos sąlygomis augintose skirtingose ląstelių linijose nustatyta alternatyviai susidarančių Fas ir sFas iRNA izoformų raiška. 18S RNR naudojama kaip kontrolinis mėginys. *B* – Fas ir sFas iRNA izoformų raiškos tyrimas RT-qPCR metodu. Nr. 1 – kontrolinis mėginys – normaliomis deguonies sąlygomis augintose ląstelių linijose nustatyta alternatyviai susidarančių Fas iRNA izoformų raiška, prilyginta 1. Skirtingų iRNA izoformų raiškos diagramos sudarytos naudojant 5 nepriklausomų eksperimentų duomenis, **p* < 0,05

3.3.1. Alternatyvios Rac1b iRNA izoformos susidarymas nuo hipoksijos nepriklauso

Pirmoje darbo dalyje, skirtingose virškinimo trakto vėžinėse ląstelių linijose atliekant Rac1 geno alternatyviai susidarančių iRNA raiškos analizę, jokių iRNA raiškos pokyčių užfiksuoti nepavyko. Buvo iškelta hipotezė, kad Rac1 pre-iRNA alternatyvų splaisingą gali veikti hipoksinė auglio mikroaplinka, todėl normaliomis deguonies sąlygomis augintose ląstelių linijose su vėžiu siejamos Rac1b iRNA izoformos raiškos padidėjimas nebuvo nustatytas. Norint patikrinti šią hipotezę, ląstelės buvo auginamos normaliomis deguonies ir hipoksijos sąlygomis. Šiam eksperimentui pasirinktos tos ląstelių linijos, kuriose nustatytas didžiausias nuo hipoksijos

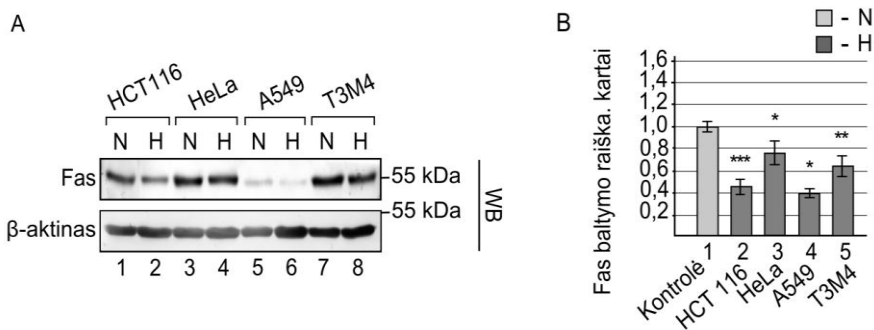
priklausomas Fas iRNR izoformų raiškos pokytis, t. y. HCT116, HeLa, A549 ir T3M4 ląstelių linijos. RT-PGR metodu atliktas Rac1 iRNR izoformų raiškos tyrimas parodė, kad tiek normaliomis deguonies, tiek hipoksijos sąlygomis augintose ląstelėse Rac1 iRNR izoformų raiška lieka nepakitusi (18 pav.). Šis tyrimas parodė, kad Rac1 pre-iRNR alternatyvusis splaisingas nuo hipoksijos nepriklauso.



18 pav. Hipoksija nereguliuoja Rac1 pre-iRNR alternatyviojo splaisingo. *A* – normaliomis (21 % O₂) (N) ir hipoksijos (1 % O₂) (H) sąlygomis augintose skirtingose ląstelių linijose susidarantių Rac1 ir Rac1b iRNR izoformų raiška, %. 18S RNR naudojama kaip kontrolinis PGR mėginys. *B* – alternatyviai susidarantių Rac1 ir Rac1b iRNR izoformų raiška, kai bendra Rac1 pre-iRNR raiška prilyginta 100 %. Skirtingų iRNR izoformų raiškos diagramos sudarytos naudojant 3 nepriklausomų eksperimentų duomenis, **p* < 0,05

3.3.1. Hipoksija įvairiose ląstelių linijose reguliuoja Fas baltymo kiekį

Hipoksija tirtose ląstelių linijose skatina sFas ir mažina Fas iRNR susidarymą. Tačiau nėra aišku, ar šie alternatyviojo splaisingo pasikeitimai sukelia nuo šių iRNR sintetinamų baltymų kiekio pasikeitimus. Nuo trumpesnės sFas iRNR izoformos sintetinamas transmembraninio sąveikos domeno neturintis baltymas pernešamas į tarpląstelinę terpę. Nuo viso ilgio Fas iRNR sintetinamas membraninis Fas baltymas, kuris nustatomas tiriant paruoštus ląstelių lizatus. Dėl šios priežasties nutarta tikrinti, kaip ląstelėse kinta membraninio Fas baltymo kiekiai. Tyrimams naudotos anksčiau pasirinktos HCT116, HeLa, A549 ir T3M4 ląstelių linijos. Norint įvertinti, ar hipoksijos inicijuoti Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo pokyčiai ląstelėse lemia viso ilgio Fas baltymo kiekio svyravimus, pasirinktos ląstelės augintos normaliomis arba hipoksijos sąlygomis. Iš šių ląstelių paruošti lizatai buvo analizuojami *Western blot* imunohibridizacijos metodu (19 pav.). Išanalizavus gautus duomenis paaiškėjo, kad visose tirtose hipoksijos sąlygomis augintose ląstelių linijose, palyginti su normaliomis sąlygomis augintomis ląstelėmis, viso ilgio Fas receptoriaus baltymo raiška sumažėjo.



19 pav. Hipoksija tirtose ląstelių linijose keičia Fas baltymo raišką. *A* – iš normaliomis (21 % O₂) (N) ir hipoksinėmis (1 % O₂) (H) aplinkos sąlygomis augintų skirtingų ląstelių paruošti lizatai analizuojami *Western blot* imunohibridizacijos metodu. β-aktinas naudojamas kaip mėginių baltymų kiekio kontrolinis mėginys. *B* – Fas baltymo raiškos pokyčiai normaliomis ir hipoksijos sąlygomis augintose skirtingose ląstelių linijose. Grafikuose pateikta Fas baltymo raiškos diagrama. Normaliomis aplinkos sąlygomis nustatyta Fas baltymo raiška prilyginama 1 (1 stulpelis, kontrolinis mėginys). 2, 3, 4 ir 5 stulpeliai rodo Fas baltymo kiekio pokyčius hipoksijos sąlygomis augintose ląstelėse, lyginant su normaliomis deguonies sąlygomis augintomis ląstelėmis (kontrolinis mėginys). Skaičiavimams naudoti 3 nepriklausomų eksperimentų duomenys, *** $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Šie rezultatai koreliuoja su Fas iRNR izoformų raiškos tyrimo duomenimis, kurie rodo, kad hipoksija ląstelėse mažina Fas iRNR raišką ir skatina sFas iRNR izoformos susidarymą (16 pav. ir 17 pav.).

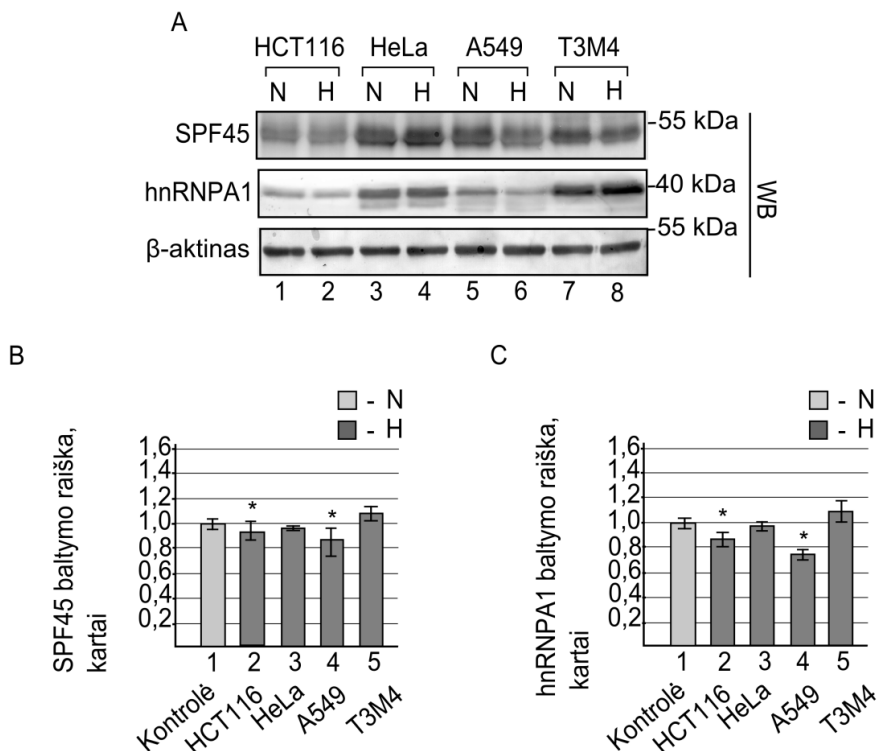
3.3.2. Splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raiška nuo hipoksijos nepriklauso

Literatūroje aprašyti įvairūs splaisingo veiksniai (SPF45, hnRNP A1, PTB, TIA-1, HuR), kurie normaliomis aplinkos sąlygomis augintose ląstelėse reguliuoja Fas pre-iRNR alternatyvųjų splaisingą (Izquierdo, Majos et al., 2005, Corsini, Bonnal et al., 2007, Izquierdo, 2008, Al-Ayoubi, Zheng et al., 2012, Kafasla, Mickleburgh et al., 2012, Liu, Conaway et al., 2013, Oh, Lee et al., 2013, Inoue, Yamamoto et al., 2014). SPF45 ir hnRNP A1 baltymai įvardijami kaip priešingu veikimu pasižymintys Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo reguliatoriai (Al-Ayoubi, Zheng et al., 2012, Liu, Conaway et al., 2013, Oh, Lee et al., 2013). Ar šie splaisingo veiksniai dalyvauja nuo hipoksijos priklausomoje Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo reguliacijoje, duomenų nėra.

Šiame tyrimų etape norėta nustatyti, ar hipoksijos sąlygomis splaisingo veiksniai SPF45 ir hnRNP A1 reguliuoja Fas pre-iRNR alternatyvųjų splaisingą. Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad kiekybiniai šių splaisingo veiksnių raiškos pokyčiai lemia Fas ir sFas iRNR izoformų raišką (Corsini, Bonnal et al., 2007, Liu, Conaway et al., 2013, Oh, Lee et al., 2013). Buvo iškelta hipotezė, kad hipoksijos inicijuoti splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 baltymų raiškos pokyčiai ląstelėse atitinkamai skatina Fas iRNR izoformų raiškos pokyčius. Šiai hipotezei patikrinti pasirinktos HCT116, HeLa, A549 ir T3M4 ląstelių linijos, kuriose buvo nustatytas didžiausias nuo hipoksijos priklausomas Fas iRNR izoformų raiškos pokytis. Ląstelės buvo augintos normaliomis deguonies ir hipoksijos sąlygomis. Iš jų paruošti lizatai tirti *Western blot* imunohibridizacijos metodu.

Tyrimas parodė, kad hipoksijos sąlygomis augintose ląstelių linijose, palyginti su ląstelių linijomis, augintomis normaliomis deguonies sąlygomis, splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 baltymų raiška kinta. Nedidelis (iki 0,15 karto) SPF45 baltymo kiekio sumažėjimas nustatytas hipoksijos sąlygomis augintose HCT116 bei A549 ląstelių linijose. Nežymiai SPF45 kiekis padidėjo T3M4 ląstelėse, o HeLa ląstelėse šio veiksnio kiekiai išliko nepakitę (20 pav., A ir B). Analogiški rezultatai gauti ir tiriant splaisingo veiksnio hnRNP A1 raišką (20 pav., A ir C).

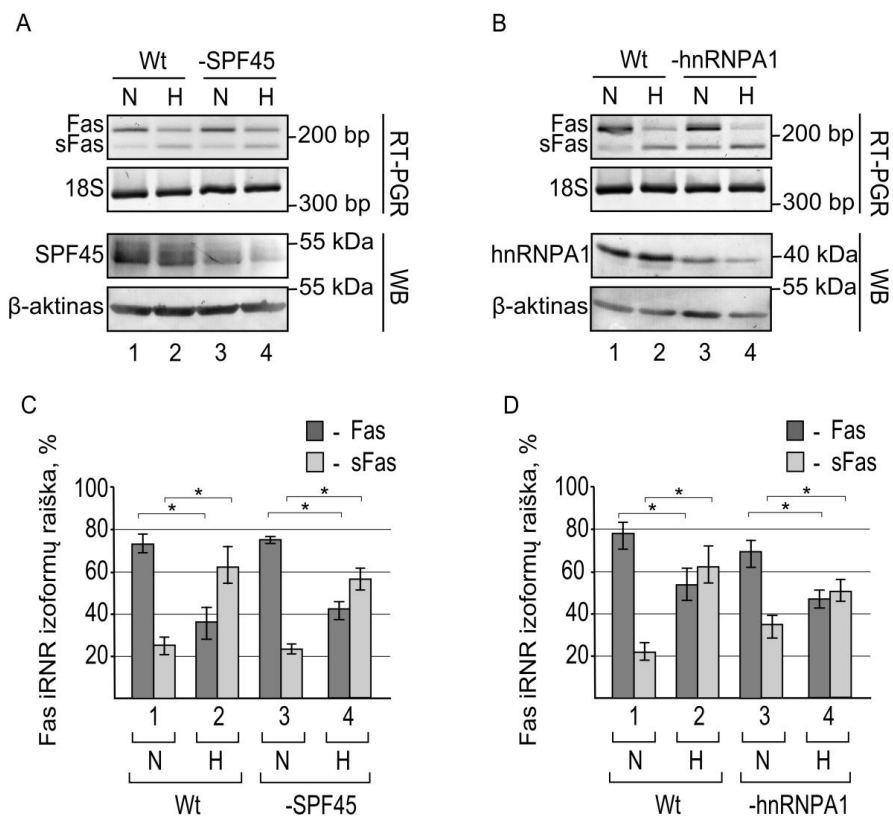
Remiantis gautais rezultatais, galima teigti, kad splaisingo veiksmų SPF45 ir hnRNP A1 baltymų raiška tirtose ląstelių linijose nuo hipoksijos nepriklauso. Nustatyti nedideli šių baltymų raiškos svyravimai labiau atspindi tarp skirtingų ląstelių linijų egzistuojančius, o ne hipoksinės aplinkos poveikio sukeltus baltymų raiškos pokyčius. Tačiau net ir skirtingose ląstelių linijose nustatytas SPF45 ir hnRNP A1 baltymų raiškos pokytis nekoreliuoja su hipoksijos sąlygomis nustatytais Fas ir RNR raiškos posikeitimais.



20 pav. Splaisingo veiksmų SPF45 ir hnRNP A1 raiška. A – splaisingo veiksmų SPF45 ir hnRNP A1 raiškos palyginimas normaliomis (21 % O₂) (N) ir hipoksijos (1 % O₂) (H) sąlygomis augintose ląstelių linijose. B – SPF45 baltymo raiškos diagrama; C – hnRNP A1 baltymo raiškos diagrama. Normaliomis aplinkos sąlygomis nustatyta baltymo raiška prilyginama 1 (1 stulpelis, kontrolinis mėginys). 2, 3, 4 ir 5 stulpeliai rodo baltymo kiekio pokyčius hipoksijos sąlygomis augintose ląstelėse, lyginant su normaliomis deguonies sąlygomis augintomis ląstelėmis (kontrolinis mėginys). Skaičiavimams naudoti 3 nepriklausomų eksperimentų duomenys, * $p < 0,05$

3.3.1. Sumažėjusi splaisingo veiksmių SPF45 ir hnRNP A1 raiška Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo nekeičia

Palyginus splaisingo veiksmių SPF45 bei hnRNP A1 raišką normaliomis ir hipoksijos sąlygomis augintose ląstelėse, nebuvo patvirtinta iškelta hipotezė, kad hipoksinė mikroaplinka keičia šių veiksmių raišką ir taip reguliuoja alternatyvųjį Fas pre-iRNR splaisingo procesą. Tačiau HCT116 ląstelių linijoje nustatytas apie 10 % siekiantis splaisingo veiksmių SPF45 bei hnRNP A1 raiškos sumažėjimas. Norint tiksliau įvertinti splaisingo veiksmių SPF45 ir hnRNP A1 reguliacines funkcijas, naudojant *CRISPR-Cas9* genų redagavimo sistemą, HCT116 ląstelėse sumažinta šių splaisingo veiksmių raiška. Atliktų eksperimentų duomenų analizė parodė, kad splaisingo veiksmio SPF45 baltymo raiškos sumažėjimas nei normaliomis, nei hipoksijos sąlygomis augintose CRISPR-SPF45 ląstelėse nepaveikė Fas ir sFas iRNR izoformų raiškos (21 pav., A ir C). Splaisingo veiksmio hnRNP A1 raiškos sumažėjimas normaliomis sąlygomis augintose CRISPR-hnRNP A1 ląstelėse iki 5 % padidina sFas iRNR susidarymą, tačiau hipoksijos sąlygomis augintose ląstelėse Fas iRNR izoformų raiškos nekeičia (21 pav., B ir D).



21 pav. Splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raiškos sumažėjimas hipoksijos sąlygomis Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo nekeičia. *A*: viršutinė dalis – Fas ir sFas iRNR izoformų raiška normaliomis (21 % O₂) (N) ir hipoksijos (1 % O₂) (H) sąlygomis augintose laukinio tipo (Wt) ir CRISPR-SPF45 paveiktose HCT116 ląstelėse; apatinė dalis – SPF45 baltymo raiškos laukinio tipo (Wt) ir CRISPR-SPF45 paveiktose HCT116 ląstelėse palyginimas. *B*: viršutinė dalis – Fas ir sFas iRNR izoformų raiška normaliomis (N) ir hipoksijos (H) sąlygomis augintose laukinio tipo (Wt) ir CRISPR-hnRNP A1 paveiktose HCT116 ląstelėse; apatinė dalis – SPF45 baltymo raiškos laukinio tipo (Wt) ir CRISPR-hnRNP A1 paveiktose HCT116 ląstelėse palyginimas. 18S RNR ir β-aktinas naudojami kaip RT-PGR ir *Western blot* (Wt) imunohibridizacijos kontroliniai mėginiai. Grafikuose pateikta Fas ir sFas iRNR izoformų raiškos laukinio tipo (Wt) ir CRISPR-SPF45 (*C*) ar CRISPR-hnRNP A1 (*D*) paveiktose ląstelėse diagrama. Bendra (Fas+sFas) iRNR raiška prilyginama 100 %. Skaičiavimams naudoti 3 nepriklausomų eksperimentų duomenys, **p* < 0,05

4. DISKUSIJA

Taikomi naujausi RNR tyrimų metodai leidžia nustatyti ne pavienius, o daugybinius ląstelėje vykstančius pre-iRNR splaisingo pokyčius. Remiantis šiais duomenimis, galima dar kartą pabrėžti, kad pre-iRNR splaisingas yra gyvybiškai svarbus ląstelėse vykstantis procesas, kuris ląstelėms padeda prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų (Blencowe, 2017, Di, Syafrizayanti et al., 2019). Pakitusi iRNR izoformų raiška nustatyta įvairių onkologinių ligų atveju. Duomenų, leidžiančių patvirtinti pre-iRNR splaisingo pokyčių ir onkogenozės tarpusavio sąsajas, nuolat daugėja (Oltean ir Bates, 2014). Pre-iRNR splaisingo pokyčiai tiesiogiai priklauso nuo šį procesą reguliuojančių splaisingo veiksnių (Dvinge, 2018).

Šiame tiriamajame darbe buvo analizuojama splaisingo veiksnių (U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP) baltymų raiška sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose. Tyrimas parodė, kad virškinimo trakto navikuose splaisingo veiksnių raiška skiriasi nuo jų raiškos sveikuose audiniuose. Gauti duomenys atitinka ir literatūroje pateikiamus rezultatus: kelios skirtingos mokslininkų grupės, atlikdamos tyrimus krūties, prostatos, smegenų, žarnyno ir kt. navikuose, taip pat nustatė įvairių splaisingo veiksnių raiškos pokyčius (Kirschbaum-Slager, Lopes et al., 2004, Koedoot, Smid et al., 2019).

Darbe atliekant splaisingo veiksnių raiškos analizę nustatyta, kad splaisingo veiksnių SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 ir KHSRP raiška kasos, gaubtinės žarnos ir skrandžio navikuose, palyginti su sveikais audiniais, mažėja nuo 1,3 iki 13,5 karto. Splaisingo veiksnių U2AF35 ir U2AF65 raiška atitinkamai skrandžio ir kasos navikuose didėja 2 kartus. Šie duomenys galėtų būti naudingi atliekant skrandžio, kasos ir gaubtinės žarnos navikų diferencinę diagnostiką.

Iš įvairių navikų kilusios ląstelių linijos yra plačiai eksperimentuose naudojama modelinė sistema, ypač pasitarnaujanti atliekant fundamentinius vėžio biologijos ir pirminius vaistų testavimo tyrimus. Tačiau klinikinėse tyrimų stadijose dalis ląstelių linijose gautų tyrimų rezultatų taip ir nepasitvirtina (Thoma, Zimmermann et al., 2014, Mirabelli, Coppola et al., 2019). Kyla klausimas, ar ląstelių linijos yra tinkama sudėtingų onkogenozės procesų tyrimų modelinė sistema. Reikia pripažinti, kad duomenų, apibūdinančių navikų ir iš jų kilusių ląstelių linijų panašumus ir skirtumus, labai trūksta. Tyrimo metu visose ląstelių linijose, lyginant su nevėžine HEK 293A ląstelių linija, nustatytas splaisingo veiksnių raiškos sumažėjimas. Šie rezultatai atitinka virškinimo trakto navikų audiniuose gautus duomenis (juose taip pat nustatytas splaisingo veiksnių raiškos sumažėjimas). Kita

vertus, virškinimo trakto navikų audiniuose nustatyta kai kurių splaisingo veiksnių raiška mažėja net iki 13 kartų, o iš tų pačių navikų išvestose ląstelių linijose nustatytas splaisingo veiksnių raiškos sumažėjimas tesiekia 2,6 karto ir su ląstelių linijose gautais rezultatais nekoreliuoja. Taip pat nei vienoje tirtoje ląstelių linijoje nenustatytas splaisingo veiksnių U2AF35 ir U2AF65 baltymų raiškos padidėjimas, kuris atitinkamai skrandžio ir kasos navikiniuose audiniuose kinta 2 kartus.

Tačiau įdomiausi rezultatai gauti tarpusavyje palyginus splaisingo veiksnių raišką virškinimo trakto navikuose ir iš šių navikų kilusiose ląstelių linijose. Paaiškėjo, kad navikuose ir ląstelių linijose splaisingo veiksnių raiškos pokyčiai yra skirtingi ir tarpusavyje nekoreliuoja. Gauti duomenys rodo, kad ląstelių linijos, kaip modelinė sistema, ne iki galo atspindi visus navikuose vykstančius biologinius procesus.

Literatūros šaltiniuose teigiama, kad splaisingą reguliuojančių veiksnių raiškos pokyčiai dažnai lemia susidarančių iRNR izoformų santykio pasikeitimus. Taip pat žinoma, kad pasikeitusi iRNR izoformų raiška yra būdingas navikų ir kitų patologinių organizmo būklių bruožas (Climente-Gonzalez, Porta-Pardo et al., 2017, Singh ir Eyras, 2017). Šiame tiriamojo darbo etape buvo analizuojamas protoonkogenų Fas ir Rac1 pre-iRNR splaisingas sveikuose bei navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose ir iš šių navikų kilusiose ląstelių linijose. Šio tyrimo metu paaiškėjo, kad Fas ir Rac1 pre-iRNR splaisingas navikuose ir sveikuose audiniuose skiriasi. Nustatytas navikams būdingas sFas bei Rac1b iRNR izoformų raiškos padidėjimas. Šie rezultatai koreliuoja su literatūroje pateiktais tyrimų rezultatais: padidėjusi sFas bei Rac1b iRNR izoformų raiška nustatyta įvairiuose navikų tipuose (Midis, Shen et al., 1996, Baldwin, Tran et al., 1999, Melzer, Hass et al., 2019).

Vėžinėse ląstelių linijose atlikus Fas bei Rac1 iRNR izoformų raiškos tyrimą, tarpusavyje palyginti navikuose ir ląstelių linijose gauti sFas/Fas bei Rac1b/Rac1 iRNR raiškos santykių duomenys. Lyginamoji analizė parodė, kad sFas ir Fas iRNR izoformų, kaip ir tirtų splaisingo veiksnių, raiška navikuose ir ląstelių linijose skiriasi. Tiksliau, iš virškinimo trakto navikų kilusiose ląstelių linijose nustatyta Fas geno iRNR raiška yra panašesnė nei augliuose, o į sveikuose audiniuose nustatytą šio geno iRNR izoformų raišką. Tačiau palyginus Rac1 geno iRNR izoformų raiškos duomenis paaiškėjo, kad Rac1b ir Rac1 izoformų raiška ląstelių linijose yra panaši į navikuose nustatytą tų pačių iRNR izoformų raišką. Panašu, kad pre-iRNR splaisingo proceso reguliaciją šiuo atveju lemia koordinuotas kelių ar net keliolikos splaisingo veiksnių poveikis.

Atliktas splaisingo veiksnių ir iRNR izoformų raiškos sveikuose, vėžiniuose audiniuose bei iš navikų kilusiose ląstelių linijose palyginimas ir nustatyti raiškos skirtumai dar kartą liudija, kad auglys yra sudėtinga ir kompleksiška veikianti sistema. Šią sistemą veikia ne tik vidiniai, t. y. genetiniai, bet ir ląstelių aplinkos veiksniai, pavyzdžiui, hipoksija (Jing, Yang et al., 2019). Šiame tyrimų etape, atliekant Fas bei Rac1 genų iRNR raiškos analizę ir tarpusavyje lyginant normaliomis ir hipoksijos sąlygomis augintose ląstelėse gautus rezultatus, paaiškėjo, kad hipoksija, t. y. pasikeitusi mikroaplinka, veikia Fas, bet ne Rac1 pre-iRNR splaisingo procesą. Šie rezultatai rodo, kad hipoksinė mikroaplinka yra Fas pre-iRNR alternatyviojo splaisingo pokyčius lemiantis veiksnys, o Rac1 pre-iRNR splaisingas nuo hipoksijos nepriklauso. Tikėtina, kad Rac1 geno iRNR izoformų susidarymo pokyčius lemia navikui būdingi genetiniai veiksniai.

Literatūros šaltiniuose taip pat teigiama, kad hipoksija yra neatsiejama kai kurių auglių mikroaplinkos dalis (Semenza, 2010, Ratcliffe, 2013, Jing, Yang et al., 2019), todėl visai nekeista, kad įvairaus tipo vėžiu sergančių pacientų kraujo serume nustatyta padidėjusi tirpaus Fas (sFas) baltymo raiška (Konno, Takano et al., 2000). Tai atspindi ir šio darbo tyrimai: hipoksijos sąlygomis augintose skirtingose ląstelių linijose, lyginant su normaliomis sąlygomis augintomis ląstelėmis, nustatytas viso ilgio Fas receptoriaus raiškos sumažėjimas. Šis hipoksijos reguliuojamas alternatyviojo pre-iRNR splaisingo pasikeitimas, kurio metu padidėja sFas iRNR izoformos raiška, leidžia paaiškinti, kaip alternatyviojo splaisingo procesas padeda vėžinei ląstelei išvengti apoptozės ir išgyventi.

Literatūros šaltiniuose nurodoma, kad priešingu veikimu pasižymintys splaisingo veiksniai SPF45 ir hnRNP A1 kiekybiškai reguliuoja 6 egzono įjungimą (prašokimą) į besiformuojančią Fas iRNR seką (Corsini, Bonnal et al., 2007, Al-Ayoubi, Zheng et al., 2012, Liu, Conaway et al., 2013, Oh, Lee et al., 2013). Darbe atliekant splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raiškos tyrimus ir tarpusavyje lyginant normaliomis ir hipoksijos sąlygomis augintas ląsteles, tam tikrose ląstelių linijose nustatyti nežymūs splaisingo veiksnių raiškos svyravimai. Papildomi tyrimai parodė, kad HCT116 ląstelėse nustatytas nedidelis splaisingo veiksnių SPF45 ir hnRNP A1 raiškos sumažėjimas nedaro įtakos nuo deguonies kiekio aplinkoje priklausomam Fas 6 egzoninės sekos įjungimui (prašokimui) į besiformuojančią Fas iRNR. Viena to priežasčių galėtų būti ta, kad šie veiksniai nedalyvauja nuo hipoksijos priklausomo Fas pre-iRNR splaisingo reguliacijoje. Kitas galimas paaiškinimas yra tas, kad hipoksinėmis aplinkos sąlygomis kinta splaisingo veiksnių modifikacijos ir dėl to kinta splaisingo veiksnių aktyvumas (Lenzken, Loffreda et al., 2013, Jakubauskiene, Vilys et al., 2015,

Anczukow ir Krainer, 2016). Taip pat negalima atmesti tikimybės, kad hipoksinėmis aplinkos sąlygomis Fas pre-iRNR 6 egzono alternatyviojo splaisingo reguliacijoje kartu su SPF45 ir (ar) hnRNP A1 dalyvauja papildomi šiuo metu dar nenustatyti splaisingo veiksniai.

Šiame darbe atliktų tyrimų duomenys rodo, kad įvairiems navikams būdinga pakitusi splaisingo veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiška (Brinkman, 2004, Kalnina, Zayakin et al., 2005, Venables, Klinck et al., 2009, Anczukow ir Krainer, 2016, Dvinge, Kim et al., 2016). Dėl to pre-iRNR splaisingo proceso reguliacija yra viena iš aktualiausių antivėžinės terapijos vystymosi krypčių. Literatūroje aprašomi bandymai vėžio gydymui pritaikyti įvairius splaisingą slopinančius arba iRNR raiškos pakitimus sukeliančius junginius (Corrionero, Minana et al., 2011, Effenberger, Urabe et al., 2017). Tačiau bandymai su pelėmis bei pradėti tam tikrų junginių klinikiniai tyrimai parodė, kad šie pre-iRNR splaisingą ląstelėse keičiantys junginiai neveikia taip, kaip jie veikė modelinėse ląstelių linijų sistemose. Pavyzdžiui, ląstelių linijose atlikti onkologinėms ligoms gydyti skirtų N-metiltransferazės slopinančių junginių tyrimai parodė, kad šie junginiai blokuoja splaisingo veiksnių modifikuojančiųjų baltymų veikimą. Jie keičia splaisosomos veikimą ir daro įtaką ląstelėse vykstantiems splaisingo procesams. Tačiau klinikiniai N-metiltransferazės slopinančių junginių tyrimai parodė, kad šių preparatų veiksmingumas yra labai ribotas (Desterro, Bak-Gordon et al., 2020). Šiuo metu literatūroje daugėja duomenų apie tai, kad ląstelių mikroaplinka daro įtaką kitiems ląstelėse vykstantiems procesams. Literatūros šaltiniuose teigiama, kad mikroaplinka veikia DNR metilinimo, transkripcijos, pre-iRNR splaisingo, translacijos procesus (Brosseau, Lucier et al., 2014, De Palma, Bizziato et al., 2017, Kim ir Costello, 2017, Zhang, Fujiwara et al., 2017, Nakayama ir Kataoka, 2019). Todėl visai nestebina tai, kad pre-iRNR splaisingo procesą veikiančius junginiai augliuose pasižymėjo tik labai ribotu veikimu. Iki šiol nėra iki galo aišku, kaip mikroaplinka veikia ląstelėse vykstančius procesus. Taip pat nėra iširti tuos procesus reguliuojantys mechanizmai. Šiame darbe gauti duomenys padės geriau suprasti, kokį poveikį ląstelėje vykstantiems procesams daro mikroaplinka, ir paaiškinti reguliacines šio poveikio funkcijas. Išsamesnis hipoksinėse ląstelėse vykstančių procesų reguliavimo supratimas padės sukurti ne tik efektyviau veikiančius su hipoksija susijusių ligų gydymui skirtus preparatus, bet ir paskatins naujų diagnostinių metodų plėtrą.

IŠVADOS

1. Palyginus splaisingo veiksmų raišką sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose nustatyta, kad SRSF1, SRSF2 ir KHSRP raiška tirtuose navikuose sumažėja; U2AF65 raiška kasos ir gaubtinės žarnos navikuose sumažėja, o skrandžio navikuose – padidėja; U2AF35 raiška sumažėja gaubtinės žarnos ir skrandžio navikuose, o kasos navikuose – padidėja.

2. Lyginant su sveikais audiniais, tirtuose navikuose nustatytas antiapoptotinės sFas iRNR padidėjimas, tuo tarpu Rac1b iRNR izoformos raiška padidėja tik skrandžio ir gaubtinės žarnos navikuose.

3. Splaisingo veiksmų SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 ir KHSRP raiška vėžinių virškinimo trakto organų ląstelių monosluksnio kultūrose, lyginant su HEK 293A ląstelių linija, sumažėja.

4. Nustatyta Fas ir Rac1 iRNR izoformų raiška monosluksnio kultivuotose vėžinių virškinimo trakto organų ląstelių linijose, neatitinka navikuose nustatyto šių iRNR izoformų raiškos profilio.

5. Hipoksinė mikroaplinka tirtose vėžinėse ląstelių linijose keičia nuo Fas pre-iRNR susidarančių iRNR izoformų raišką, tačiau Rac1 iRNR izoformų raiška nuo hipoksijos nepriklauso.

6. Splaisingo veiksmų SPF45 ir hnRNP A1 raiška HCT116, HeLa, A549 ir T3M4 ląstelių linijose nuo hipoksinės mikroaplinkos nepriklauso.

7. Splaisingo veiksmų SPF45 ir hnRNP A1 raiškos sumažinimas hipoksinėse HCT116 ląstelėse neturi įtakos sFas iRNR izoformos susidarymui.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **3**(9): 745-756.
2. Ahsan, K. B., A. Masuda, M. A. Rahman, J. I. Takeda, M. Nazim, B. Ohkawara, M. Ito and K. Ohno (2017). "SRSF1 suppresses selection of intron-distal 5' splice site of DOK7 intron 4 to generate functional full-length Dok-7 protein." Sci Rep **7**(1): 10446.
3. Al-Ayoubi, A. M., H. Zheng, Y. Liu, T. Bai and S. T. Eblen (2012). "Mitogen-activated protein kinase phosphorylation of splicing factor 45 (SPF45) regulates SPF45 alternative splicing site utilization, proliferation, and cell adhesion." Mol Cell Biol **32**(14): 2880-2893.
4. Anczukow, O. and A. R. Krainer (2016). "Splicing-factor alterations in cancers." RNA **22**(9): 1285-1301.
5. Anna, A. and G. Monika (2018). "Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation." J Appl Genet **59**(3): 253-268.
6. Arrowsmith, J. (2011). "Trial watch: phase III and submission failures: 20507-2010." Nat Rev Drug Discov **10**(2): 87.
7. Azubel, M., S. G. Wolf, J. Sperling and R. Sperling (2004). "Three-dimensional structure of the native spliceosome by cryo-electron microscopy." Mol Cell **15**(5): 833-839.
8. Baldwin, R. L., H. Tran and B. Y. Karlan (1999). "Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis." Gynecol Oncol **74**(2): 265-271.
9. Basu, M. K., W. Makalowski, I. B. Rogozin and E. V. Koonin (2008). "U12 intron positions are more strongly conserved between animals and plants than U2 intron positions." Biol Direct **3**: 19.
10. Benej, M., S. Pastorekova and J. Pastorek (2014). "Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer." Subcell Biochem **75**: 199-219.
11. Beqqali, A. (2018). "Alternative splicing in cardiomyopathy." Biophys Rev **10**(4): 1061-1071.
12. Bessonov, S., M. Anokhina, A. Krasauskas, M. M. Golas, B. Sander, C. L. Will, H. Urlaub, H. Stark and R. Luhrmann (2010). "Characterization of purified human Bact spliceosomal complexes reveals compositional and morphological changes during spliceosome activation and first step catalysis." RNA **16**(12): 2384-2403.
13. Bikkavilli, R. K., S. A. Zerayesus, M. Van Scoyk, L. Wilson, P. Y. Wu, A. Baskaran, K. Tang, S. Raheem, B. A. Samuelson, N. M. Reddy, S. P. Reddy, C. D. Cool, B. Kosmider, S. Avasarala and R. A. Winn (2017). "K-homology splicing regulatory protein (KSRP) promotes post-transcriptional destabilization of Spry4 transcripts in non-small cell lung cancer." J Biol Chem **292**(18): 7423-7434.
14. Bingle, C. D., R. W. Craig, B. M. Swales, V. Singleton, P. Zhou and M. K. Whyte (2000). "Exon skipping in Mcl-1 results in a bcl-2 homology

domain 3 only gene product that promotes cell death." J Biol Chem **275**(29): 22136-22146.

15. Biselli-Chicote, P. M., A. R. Oliveira, E. C. Pavarino and E. M. Goloni-Bertollo (2012). "VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer." J Cancer Res Clin Oncol **138**(3): 363-370.

16. Black, D. L. (2000). "Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology." Cell **103**(3): 367-370.

17. Bleau, A. M., N. Planque and B. Perbal (2005). "CCN proteins and cancer: two to tango." Front Biosci **10**: 998-1009.

18. Blencowe, B. J. (2017). "The Relationship between Alternative Splicing and Proteomic Complexity." Trends Biochem Sci **42**(6): 407-408.

19. Boesler, C., N. Rigo, M. M. Anokhina, M. J. Tauchert, D. E. Agafonov, B. Kastner, H. Urlaub, R. Ficner, C. L. Will and R. Luhrmann (2016). "A spliceosome intermediate with loosely associated tri-snRNP accumulates in the absence of Prp28 ATPase activity." Nature Communications **7**.

20. Bonomi, S., S. Gallo, M. Catillo, D. Pignataro, G. Biamonti and C. Ghigna (2013). "Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy." Int J Cell Biol **2013**: 962038.

21. Bowler, E., S. Porazinski, S. Uzor, P. Thibault, M. Durand, E. Lapointe, K. M. A. Rouschop, J. Hancock, I. Wilson and M. Ladomery (2018). "Hypoxia leads to significant changes in alternative splicing and elevated expression of CLK splice factor kinases in PC3 prostate cancer cells." BMC Cancer **18**(1): 355.

22. Briata, P., D. Bordo, M. Puppo, F. Gorlero, M. Rossi, N. Perrone-Bizzozero and R. Gherzi (2016). "Diverse roles of the nucleic acid-binding protein KHSRP in cell differentiation and disease." Wiley Interdiscip Rev RNA **7**(2): 227-240.

23. Brinkman, B. M. (2004). "Splice variants as cancer biomarkers." Clin Biochem **37**(7): 584-594.

24. Brock, J. E., R. C. Dietrich and R. A. Padgett (2008). "Mutational analysis of the U12-dependent branch site consensus sequence." RNA **14**(11): 2430-2439.

25. Brosseau, J. P., J. F. Lucier, H. Nwilati, P. Thibault, D. Garneau, D. Gendron, M. Durand, S. Couture, E. Lapointe, P. Prinos, R. Klinck, J. P. Perreault, B. Chabot and S. Abou-Elela (2014). "Tumor microenvironment-associated modifications of alternative splicing." RNA **20**(2): 189-201.

26. Brown, J. M. (1999). "The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture." Cancer Res **59**(23): 5863-5870.

27. Burge, C. B., R. A. Padgett and P. A. Sharp (1998). "Evolutionary fates and origins of U12-type introns." Mol Cell **2**(6): 773-785.

28. Bustelo, X. R., V. Ojeda, M. Barreira, V. Sauzeau and A. Castro-Castro (2012). "Rac-ing to the plasma membrane: the long and complex work commute of Rac1 during cell signaling." Small GTPases **3**(1): 60-66.
29. Cascino, I., G. Papoff, A. Eramo and G. Ruberti (1996). "Soluble Fas/Apo-1 splicing variants and apoptosis." Front Biosci **1**: d12-18.
30. Charleston, J. S., F. J. Schnell, J. Dworzak, C. Donoghue, S. Lewis, L. Chen, G. D. Young, A. J. Milici, J. Voss, U. DeAlwis, B. Wentworth, L. R. Rodino-Klapac, Z. Sahenk, D. Frank and J. R. Mendell (2018). "Eteplirsen treatment for Duchenne muscular dystrophy: Exon skipping and dystrophin production." Neurology **90**(24): e2146-e2154.
31. Chen, W., Q. Jia, Y. Song, H. Fu, G. Wei and T. Ni (2017). "Alternative Polyadenylation: Methods, Findings, and Impacts." Genomics Proteomics Bioinformatics **15**(5): 287-300.
32. Cherfils, J. and M. Zeghouf (2011). "Chronicles of the GTPase switch." Nat Chem Biol **7**(8): 493-495.
33. Climente-Gonzalez, H., E. Porta-Pardo, A. Godzik and E. Eyras (2017). "The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer." Cell Rep **20**(9): 2215-2226.
34. Coltri, P. P., M. G. P. Dos Santos and G. H. G. da Silva (2019). "Splicing and cancer: Challenges and opportunities." Wiley Interdiscip Rev RNA **10**(3): e1527.
35. Cooper, T. A., L. Wan and G. Dreyfuss (2009). "RNA and disease." Cell **136**(4): 777-793.
36. Corrionero, A., B. Minana and J. Valcarcel (2011). "Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A." Genes Dev **25**(5): 445-459.
37. Corsini, L., S. Bonnal, J. Basquin, M. Hothorn, K. Scheffzek, J. Valcarcel and M. Sattler (2007). "U2AF-homology motif interactions are required for alternative splicing regulation by SPF45." Nat Struct Mol Biol **14**(7): 620-629.
38. D'Alessio, J. A., K. J. Wright and R. Tjian (2009). "Shifting players and paradigms in cell-specific transcription." Mol Cell **36**(6): 924-931.
39. Das, R., Z. L. Zhou and R. Reed (2000). "Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E." Molecular Cell **5**(5): 779-787.
40. De, P., J. C. Aske and N. Dey (2019). "RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors." Cells **8**(5).
41. De, P., J. H. Carlson, T. Jepperson, S. Willis, B. Leyland-Jones and N. Dey (2017). "RAC1 GTP-ase signals Wnt-beta-catenin pathway mediated integrin-directed metastasis-associated tumor cell phenotypes in triple negative breast cancers." Oncotarget **8**(2): 3072-3103.
42. De Palma, M., D. Biziato and T. V. Petrova (2017). "Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis." Nat Rev Cancer **17**(8): 457-474.

43. Denichenko, P., M. Mogilevsky, A. Clery, T. Welte, J. Biran, O. Shimshon, G. D. Barnabas, M. Danan-Gotthold, S. Kumar, E. Yavin, E. Y. Levanon, F. H. Allain, T. Geiger, G. Levkowitz and R. Karni (2019). "Specific inhibition of splicing factor activity by decoy RNA oligonucleotides." Nat Commun **10**(1): 1590.
44. Desterro, J., P. Bak-Gordon and M. Carmo-Fonseca (2020). "Targeting mRNA processing as an anticancer strategy." Nat Rev Drug Discov **19**(2): 112-129.
45. Di, C., Syafrizayanti, Q. Zhang, Y. Chen, Y. Wang, X. Zhang, Y. Liu, C. Sun, H. Zhang and J. D. Hoheisel (2019). "Function, clinical application, and strategies of Pre-mRNA splicing in cancer." Cell Death Differ **26**(7): 1181-1194.
46. Ding, W. Q., S. M. Kuntz and L. J. Miller (2002). "A misspliced form of the cholecystokinin-B/gastrin receptor in pancreatic carcinoma: role of reduced sellular U2AF35 and a suboptimal 3'-splicing site leading to retention of the fourth intron." Cancer Res **62**(3): 947-952.
47. Douglas, A. G. and M. J. Wood (2011). "RNA splicing: disease and therapy." Brief Funct Genomics **10**(3): 151-164.
48. Dreyfuss, G., V. N. Kim and N. Kataoka (2002). "Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(3): 195-205.
49. Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinolroma and C. G. Burd (1993). "Hnrnp Proteins and the Biogenesis of Messenger-Rna." Annual Review of Biochemistry **62**: 289-321.
50. Dunwoodie, S. L. (2009). "The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo." Dev Cell **17**(6): 755-773.
51. Dvinge, H. (2018). "Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives." FEBS Lett **592**(17): 2987-3006.
52. Dvinge, H., E. Kim, O. Abdel-Wahab and R. K. Bradley (2016). "RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors." Nat Rev Cancer **16**(7): 413-430.
53. Effenberger, K. A., V. K. Urabe and M. S. Jurica (2017). "Modulating splicing with small molecular inhibitors of the spliceosome." Wiley Interdiscip Rev RNA **8**(2).
54. Evans, S. M. and C. J. Koch (2003). "Prognostic significance of tumor oxygenation in humans." Cancer Lett **195**(1): 1-16.
55. Faustino, N. A. and T. A. Cooper (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." Genes Dev **17**(4): 419-437.
56. Fiegen, D., L. C. Haeusler, L. Blumenstein, U. Herbrand, R. Dvorsky, I. R. Vetter and M. R. Ahmadian (2004). "Alternative splicing of Rac1 generates Rac1b, a self-activating GTPase." J Biol Chem **279**(6): 4743-4749.
57. Fu, X. D. (2017). "Both sides of the same coin: Rac1 splicing regulating by EGF signaling." Cell Research **27**(4): 455-456.
58. Fujita, Y., K. Masuda, J. Hamada, K. Shoda, T. Naruto, S. Hamada, Y. Miyakami, T. Kohmoto, M. Watanabe, R. Takahashi, S. Tange, M. Saito,

- Y. Kudo, H. Fujiwara, D. Ichikawa, A. Tangoku, E. Otsuji and I. Imoto (2017). "KH-type splicing regulatory protein is involved in esophageal squamous cell carcinoma progression." Oncotarget **8**(60): 101130-101145.
59. Gang, H., Y. Hai, R. Dhingra, J. W. Gordon, N. Yurkova, Y. Aviv, H. Li, F. Aguilar, A. Marshall, E. Leygue and L. A. Kirshenbaum (2011). "A novel hypoxia-inducible spliced variant of mitochondrial death gene Bnip3 promotes survival of ventricular myocytes." Circ Res **108**(9): 1084-1092.
60. Geuens, T., D. Bouhy and V. Timmerman (2016). "The hnRNP family: insights into their role in health and disease." Hum Genet **135**(8): 851-867.
61. Giaccia, A. J., M. C. Simon and R. Johnson (2004). "The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease." Genes Dev **18**(18): 2183-2194.
62. Goncalves, V., P. Matos and P. Jordan (2009). "Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways." Hum Mol Genet **18**(19): 3696-3707.
63. Govek, E. E., S. E. Newey and L. Van Aelst (2005). "The role of the Rho GTPases in neuronal development." Genes Dev **19**(1): 1-49.
64. Graveley, B. R. (2000). "Sorting out the complexity of SR protein functions." Rna **6**(9): 1197-1211.
65. Graveley, B. R. (2002). "Sex, AGility, and the regulation of alternative splicing." Cell **109**(4): 409-412.
66. Grosso, A. R., S. Martins and M. Carmo-Fonseca (2008). "The emerging role of splicing factors in cancer." EMBO Rep **9**(11): 1087-1093.
67. Guo, J. U., V. Agarwal, H. Guo and D. P. Bartel (2014). "Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs." Genome Biol **15**(7): 409.
68. Han, J., J. Li, J. C. Ho, G. S. Chia, H. Kato, S. Jha, H. Yang, L. Poellinger and K. L. Lee (2017). "Hypoxia is a Key Driver of Alternative Splicing in Human Breast Cancer Cells." Sci Rep **7**(1): 4108.
69. Han, S. P., Y. H. Tang and R. Smith (2010). "Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives." Biochem J **430**(3): 379-392.
70. Hansen, T. B., T. I. Jensen, B. H. Clausen, J. B. Bramsen, B. Finsen, C. K. Damgaard and J. Kjems (2013). "Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges." Nature **495**(7441): 384-388.
71. Hatcher, J. M., G. Wu, C. Zeng, J. Zhu, F. Meng, S. Patel, W. Wang, S. B. Ficarro, A. L. Leggett, C. E. Powell, J. A. Marto, K. Zhang, J. C. Ki Ngo, X. D. Fu, T. Zhang and N. S. Gray (2018). "SRPKIN-1: A Covalent SRPK1/2 Inhibitor that Potently Converts VEGF from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoform." Cell Chem Biol **25**(4): 460-470 e466.
72. Havens, M. A., D. M. Duelli and M. L. Hastings (2013). "Targeting RNA splicing for disease therapy." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(3): 247-266.
73. Hellmich, M. R., X. L. Rui, H. L. Hellmich, R. Y. Fleming, B. M. Evers and C. M. Townsend, Jr. (2000). "Human colorectal cancers express a

constitutively active cholecystokinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth." J Biol Chem **275**(41): 32122-32128.

74. Hirschfeld, M., A. zur Hausen, H. Bettendorf, M. Jager and E. Stickeler (2009). "Alternative splicing of Cyr61 is regulated by hypoxia and significantly changed in breast cancer." Cancer Res **69**(5): 2082-2090.

75. Horowitz, D. S. (2012). "The mechanism of the second step of pre-mRNA splicing." Wiley Interdiscip Rev RNA **3**(3): 331-350.

76. Inoue, A., N. Yamamoto, M. Kimura, K. Nishio, H. Yamane and K. Nakajima (2014). "RBM10 regulates alternative splicing." FEBS Lett **588**(6): 942-947.

77. Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto and S. Nagata (1991). "The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis." Cell **66**(2): 233-243.

78. Ivanov, A., S. Memczak, E. Wyler, F. Torti, H. T. Porath, M. R. Orejuela, M. Piechotta, E. Y. Levanon, M. Landthaler, C. Dieterich and N. Rajewsky (2015). "Analysis of intron sequences reveals hallmarks of circular RNA biogenesis in animals." Cell Rep **10**(2): 170-177.

79. Ivanov, V. N., Z. Ronai and T. K. Hei (2006). "Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis." J Biol Chem **281**(3): 1840-1852.

80. Iwai, K., M. Yaguchi, K. Nishimura, Y. Yamamoto, T. Tamura, D. Nakata, R. Dairiki, Y. Kawakita, R. Mizojiri, Y. Ito, M. Asano, H. Maezaki, Y. Nakayama, M. Kaishima, K. Hayashi, M. Teratani, S. Miyakawa, M. Iwatani, M. Miyamoto, M. G. Klein, W. Lane, G. Snell, R. Tjhen, X. He, S. Pulukuri and T. Nomura (2018). "Anti-tumor efficacy of a novel CLK inhibitor via targeting RNA splicing and MYC-dependent vulnerability." EMBO Mol Med **10**(6).

81. Izquierdo, J. M. (2008). "Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition." J Biol Chem **283**(27): 19077-19084.

82. Izquierdo, J. M., N. Majos, S. Bonnal, C. Martinez, R. Castelo, R. Guigo, D. Bilbao and J. Valcarcel (2005). "Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition." Mol Cell **19**(4): 475-484.

83. Yang, Q., J. Zhao, W. Zhang, D. Chen and Y. Wang (2019). "Aberrant alternative splicing in breast cancer." J Mol Cell Biol.

84. Yoshimi, A. and O. Abdel-Wahab (2017). "Molecular Pathways: Understanding and Targeting Mutant Spliceosomal Proteins." Clinical Cancer Research **23**(2): 336-341.

85. Jacob, A. G. and C. W. J. Smith (2017). "Intron retention as a component of regulated gene expression programs." Hum Genet **136**(9): 1043-1057.

86. Jayasinghe, R. G., S. Cao, Q. Gao, M. C. Wendl, N. S. Vo, S. M. Reynolds, Y. Zhao, H. Climente-Gonzalez, S. Chai, F. Wang, R. Varghese, M. Huang, W. W. Liang, M. A. Wyczalkowski, S. Sengupta, Z. Li, S. H. Payne, D. Fenyo, J. H. Miner, M. J. Walter, N. Cancer Genome Atlas Research, B. Vincent, E. Eyra, K. Chen, I. Shmulevich, F. Chen and L. Ding (2018). "Systematic Analysis of Splice-Site-Creating Mutations in Cancer." Cell Rep **23**(1): 270-281 e273.
87. Jakubauskiene, E., L. Vilys, Y. Makino, L. Poellinger and A. Kanopka (2015). "Increased Serine-Arginine (SR) Protein Phosphorylation Changes Pre-mRNA Splicing in Hypoxia." J Biol Chem **290**(29): 18079-18089.
88. Jean-Philippe, J., S. Paz and M. Caputi (2013). "hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression." Int J Mol Sci **14**(9): 18999-19024.
89. Jeong, S. (2017). "SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA." Mol Cells **40**(1): 1-9.
90. Jing, X., F. Yang, C. Shao, K. Wei, M. Xie, H. Shen and Y. Shu (2019). "Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment." Mol Cancer **18**(1): 157.
91. Jordan, P., R. Brazao, M. G. Boavida, C. Gespach and E. Chastre (1999). "Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors." Oncogene **18**(48): 6835-6839.
92. Kaelin, W. G., Jr. and P. J. Ratcliffe (2008). "Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway." Mol Cell **30**(4): 393-402.
93. Kafasla, P., I. Mickleburgh, M. Llorian, M. Coelho, C. Gooding, D. Cherny, A. Joshi, O. Kotik-Kogan, S. Curry, I. C. Eperon, R. J. Jackson and C. W. Smith (2012). "Defining the roles and interactions of PTB." Biochem Soc Trans **40**(4): 815-820.
94. Kalnina, Z., P. Zayakin, K. Silina and A. Line (2005). "Alterations of pre-mRNA splicing in cancer." Genes Chromosomes Cancer **42**(4): 342-357.
95. Kamat, A., M. M. Hinshelwood, B. A. Murry and C. R. Mendelson (2002). "Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans." Trends Endocrinol Metab **13**(3): 122-128.
96. Kanopka, A. (2017). "Cell survival: Interplay between hypoxia and pre-mRNA splicing." Exp Cell Res **356**(2): 187-191.
97. Kanopka, A. (2017). "Cell survival: Interplay between hypoxia and pre-mRNA splicing." Experimental Cell Research **356**(2): 187-191.
98. Karni, R., E. de Stanchina, S. W. Lowe, R. Sinha, D. Mu and A. R. Krainer (2007). "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene." Nat Struct Mol Biol **14**(3): 185-193.
99. Kedzierska, H., P. Poplawski, G. Hoser, B. Rybicka, K. Rodzik, E. Sokol, J. Boguslawska, Z. Tanski, A. Fogtman, M. Koblowska and A. Piekielko-Witkowska (2016). "Decreased Expression of SRSF2 Splicing Factor Inhibits Apoptotic Pathways in Renal Cancer." Int J Mol Sci **17**(10).

100. Kewley, R. J., M. L. Whitelaw and A. Chapman-Smith (2004). "The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators." Int J Biochem Cell Biol **36**(2): 189-204.
101. Khan, S. G., K. Yamanegi, Z. M. Zheng, J. Boyle, K. Imoto, K. S. Oh, C. C. Baker, E. Gozukara, A. Metin and K. H. Kraemer (2010). "XPC branch-point sequence mutations disrupt U2 snRNP binding, resulting in abnormal pre-mRNA splicing in xeroderma pigmentosum patients." Hum Mutat **31**(2): 167-175.
102. Kim, M. and J. Costello (2017). "DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory." Exp Mol Med **49**(4): e322.
103. Kirschbaum-Slager, N., G. M. Lopes, P. A. Galante, G. J. Riggins and S. J. de Souza (2004). "Splicing factors are differentially expressed in tumors." Genet Mol Res **3**(4): 512-520.
104. Knipping, E., K. M. Debatin, K. Stricker, B. Heilig, A. Eder and P. H. Krammer (1995). "Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias." Blood **85**(6): 1562-1569.
105. Koedoot, E., M. Smid, J. A. Foekens, J. W. M. Martens, S. E. Le Devedec and B. van de Water (2019). "Co-regulated gene expression of splicing factors as drivers of cancer progression." Sci Rep **9**(1): 5484.
106. Konno, R., T. Takano, S. Sato and A. Yajima (2000). "Serum soluble fas level as a prognostic factor in patients with gynecological malignancies." Clin Cancer Res **6**(9): 3576-3580.
107. Koren, E., G. Lev-Maor and G. Ast (2007). "The emergence of alternative 3' and 5' splice site exons from constitutive exons." PLoS Comput Biol **3**(5): e95.
108. LA, O. R., L. Tai, L. Lee, E. A. Kruse, S. Grabow, W. D. Fairlie, N. M. Haynes, D. M. Tarlinton, J. G. Zhang, G. T. Belz, M. J. Smyth, P. Bouillet, L. Robb and A. Strasser (2009). "Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis." Nature **461**(7264): 659-663.
109. Lando, D., D. J. Peet, J. J. Gorman, D. A. Whelan, M. L. Whitelaw and R. K. Bruick (2002). "FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor." Genes Dev **16**(12): 1466-1471.
110. Lavrik, I. N. and P. H. Krammer (2009). "Life and Death Decisions in the CD95 System: Main Pro-and Anti-Apoptotic Modulators." Acta Naturae **1**(1): 80-83.
111. Lee, J. W., S. H. Bae, J. W. Jeong, S. H. Kim and K. W. Kim (2004). "Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions." Exp Mol Med **36**(1): 1-12.
112. Lefebvre, S., L. Burglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, M. Zeviani and et al. (1995). "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene." Cell **80**(1): 155-165.

113. Lenzken, S. C., A. Loffreda and S. M. Barabino (2013). "RNA splicing: a new player in the DNA damage response." Int J Cell Biol **2013**: 153634.
114. Liang, D. and J. E. Wilusz (2014). "Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production." Genes Dev **28**(20): 2233-2247.
115. Liu, Y., L. Conaway, J. Rutherford Bethard, A. M. Al-Ayoubi, A. Thompson Bradley, H. Zheng, S. A. Weed and S. T. Eblen (2013). "Phosphorylation of the alternative mRNA splicing factor 45 (SPF45) by Clk1 regulates its splice site utilization, cell migration and invasion." Nucleic Acids Res **41**(9): 4949-4962.
116. Liu, L. L., N. Xie, S. Sun, S. Plymate, E. Mostaghel and X. Dong (2014). "Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells." Oncogene **33**(24): 3140-3150.
117. Loerch, S. and C. L. Kielkopf (2016). "Unmasking the U2AF homology motif family: a bona fide protein-protein interaction motif in disguise." RNA **22**(12): 1795-1807.
118. Long, J. C. and J. F. Caceres (2009). "The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression." Biochem J **417**(1): 15-27.
119. Lukiw, W. J. (2013). "Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD)." Front Genet **4**: 307.
120. Makino, Y., R. Cao, K. Svensson, G. Bertilsson, M. Asman, H. Tanaka, Y. Cao, A. Berkenstam and L. Poellinger (2001). "Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression." Nature **414**(6863): 550-554.
121. Manley, J. L. and A. R. Krainer (2010). "A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins)." Genes Dev **24**(11): 1073-1074.
122. Masoud, G. N. and W. Li (2015). "HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy." Acta Pharm Sin B **5**(5): 378-389.
123. Matlin, A. J., F. Clark and C. W. Smith (2005). "Understanding alternative splicing: towards a cellular code." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 386-398.
124. Melzer, C., R. Hass, H. Lehnert and H. Ungefroren (2019). "RAC1B: A Rho GTPase with Versatile Functions in Malignant Transformation and Tumor Progression." Cells **8**(1).
125. Michelson, D., E. Ciafaloni, S. Ashwal, E. Lewis, P. Narayanaswami, M. Oskoui and M. J. Armstrong (2018). "Evidence in focus: Nusinersen use in spinal muscular atrophy: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology." Neurology **91**(20): 923-933.
126. Midis, G. P., Y. Shen and L. B. Owen-Schaub (1996). "Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy." Cancer Res **56**(17): 3870-3874.

127. Min, H., C. W. Turck, J. M. Nikolic and D. L. Black (1997). "A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer." Genes Dev **11**(8): 1023-1036.
128. Mirabelli, P., L. Coppola and M. Salvatore (2019). "Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research." Cancers (Basel) **11**(8).
129. Miura, K., W. Fujibuchi and M. Unno (2012). "Splice variants in apoptotic pathway." Exp Oncol **34**(3): 212-217.
130. Mullen, M. P., C. W. Smith, J. G. Patton and B. Nadal-Ginard (1991). "Alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection: competition between branchpoint/polypyrimidine tracts determines default exon choice." Genes Dev **5**(4): 642-655.
131. Nakayama, K. and N. Kataoka (2019). "Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions." Int J Mol Sci **20**(13).
132. Nigro, J. M., K. R. Cho, E. R. Fearon, S. E. Kern, J. M. Ruppert, J. D. Oliner, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1991). "Scrambled exons." Cell **64**(3): 607-613.
133. Nilsen, T. W. and B. R. Graveley (2010). "Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing." Nature **463**(7280): 457-463.
134. Oh, H., E. Lee, H. N. Jang, J. Lee, H. Moon, Z. Sheng, Y. Jun, T. J. Loh, S. Cho, J. Zhou, M. R. Green, X. Zheng and H. Shen (2013). "hnRNP A1 contacts exon 5 to promote exon 6 inclusion of apoptotic Fas gene." Apoptosis **18**(7): 825-835.
135. Olson, B. J. and J. Markwell (2007). "Assays for determination of protein concentration." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 3**: Unit 3 4.
136. Oltean, S. and D. O. Bates (2014). "Hallmarks of alternative splicing in cancer." Oncogene **33**(46): 5311-5318.
137. Pan, Q., O. Shai, L. J. Lee, B. J. Frey and B. J. Blencowe (2008). "Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing." Nat Genet **40**(12): 1413-1415.
138. Papasaikas, P. and J. Valcarcel (2016). "The Spliceosome: The Ultimate RNA Chaperone and Sculptor." Trends Biochem Sci **41**(1): 33-45.
139. Parmar, K., P. Mauch, J. A. Vergilio, R. Sackstein and J. D. Down (2007). "Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(13): 5431-5436.
140. Paronetto, M. P., I. Passacantilli and C. Sette (2016). "Alternative splicing and cell survival: from tissue homeostasis to disease." Cell Death Differ **23**(12): 1919-1929.
141. Pastorekova, S. and R. J. Gillies (2019). "The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond." Cancer Metastasis Rev **38**(1-2): 65-77.
142. Pelisch, F., D. Khauv, G. Risso, M. Stallings-Mann, M. Blaustein, L. Quadrana, D. C. Radisky and A. Srebrow (2012). "Involvement of hnRNP

A1 in the matrix metalloprotease-3-dependent regulation of Rac1 pre-mRNA splicing." J Cell Biochem **113**(7): 2319-2329.

143. Perry, W. L., 3rd, R. L. Shepard, J. Sampath, B. Yaden, W. W. Chin, P. W. Iversen, S. Jin, A. Lesoon, K. A. O'Brien, V. L. Peek, M. Rolfe, A. Shyjan, M. Tighe, M. Williamson, V. Krishnan, R. E. Moore and A. H. Dantzig (2005). "Human splicing factor SPF45 (RBM17) confers broad multidrug resistance to anticancer drugs when overexpressed--a phenotype partially reversed by selective estrogen receptor modulators." Cancer Res **65**(15): 6593-6600.

144. Philips, A. V. and T. A. Cooper (2000). "RNA processing and human disease." Cell Mol Life Sci **57**(2): 235-249.

145. Rankin, E. B. and A. J. Giaccia (2008). "The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis." Cell Death Differ **15**(4): 678-685.

146. Ratcliffe, P. J. (2013). "Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer." J Physiol **591**(8): 2027-2042.

147. Richard, S. (2010). "Reaching for the stars: Linking RNA binding proteins to diseases." Adv Exp Med Biol **693**: 142-157.

148. Rossman, K. L., C. J. Der and J. Sondek (2005). "GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(2): 167-180.

149. Ruberti, G., I. Cascino, G. Papoff and A. Eramo (1996). "Fas splicing variants and their effect on apoptosis." Adv Exp Med Biol **406**: 125-134.

150. Saldanha, R., G. Mohr, M. Belfort and A. M. Lambowitz (1993). "Group I and group II introns." FASEB J **7**(1): 15-24.

151. Sampath, J., P. R. Long, R. L. Shepard, X. Xia, V. Devanarayan, G. E. Sandusky, W. L. Perry, 3rd, A. H. Dantzig, M. Williamson, M. Rolfe and R. E. Moore (2003). "Human SPF45, a splicing factor, has limited expression in normal tissues, is overexpressed in many tumors, and can confer a multidrug-resistant phenotype to cells." Am J Pathol **163**(5): 1781-1790.

152. Sanz, D. J., J. A. Hollywood, M. F. Scallan and P. T. Harrison (2017). "Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA." PLoS One **12**(9): e0184009.

153. Schmucker, D., J. C. Clemens, H. Shu, C. A. Worby, J. Xiao, M. Muda, J. E. Dixon and S. L. Zipursky (2000). "Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity." Cell **101**(6): 671-684.

154. Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.

155. Semenza, G. L. (2010). "HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 51-56.

156. Semenza, G. L. (2014). "Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology." Annu Rev Pathol **9**: 47-71.
157. Shao, W., H. S. Kim, Y. Cao, Y. Z. Xu and C. C. Query (2012). "A U1-U2 snRNP Interaction Network during Intron Definition." Molecular and Cellular Biology **32**(2): 470-478.
158. Shepard, P. J. and K. J. Hertel (2009). "The SR protein family." Genome Biol **10**(10): 242.
- 159 Singh, B. and E. Eyraas (2017). "The role of alternative splicing in cancer." Transcription **8**(2): 91-98.
160. Symoens, S., F. Malfait, P. Vlummens, T. Hermans-Le, D. Syx and A. De Paepe (2011). "A novel splice variant in the N-propeptide of COL5A1 causes an EDS phenotype with severe kyphoscoliosis and eye involvement." PLoS One **6**(5): e20121.
- 161 Spellman, R. and C. W. Smith (2006). "Novel modes of splicing repression by PTB." Trends Biochem Sci **31**(2): 73-76.
162. Sterne-Weiler, T. and J. R. Sanford (2014). "Exon identity crisis: disease-causing mutations that disrupt the splicing code." Genome Biol **15**(1): 201.
163. Stevens, M. and S. Oltean (2018). "Modulation of VEGF-A Alternative Splicing as a Novel Treatment in Chronic Kidney Disease." Genes **9**(2).
164. Stevens, M. and S. Oltean (2019). "Modulation of the Apoptosis Gene Bcl-x Function Through Alternative Splicing." Front Genet **10**: 804.
165. Strasser, A., P. J. Jost and S. Nagata (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." Immunity **30**(2): 180-192.
166. Sugnet, C. W., W. J. Kent, M. Ares, Jr. and D. Haussler (2004). "Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice." Pac Symp Biocomput: 66-77.
167. Takahara, K., U. Schwarze, Y. Imamura, G. G. Hoffman, H. Toriello, L. T. Smith, P. H. Byers and D. S. Greenspan (2002). "Order of intron removal influences multiple splice outcomes, including a two-exon skip, in a COL5A1 acceptor-site mutation that results in abnormal pro-alpha1(V) N-propeptides and Ehlers-Danlos syndrome type I." Am J Hum Genet **71**(3): 451-465.
168. Tari, M., V. Manceau, J. de Matha Salone, A. Kobayashi, D. Pastre and A. Maucier (2019). "U2AF(65) assemblies drive sequence-specific splice site recognition." EMBO Rep **20**(8): e47604.
169. Thoma, C. R., M. Zimmermann, I. Agarkova, J. M. Kelm and W. Krek (2014). "3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery." Adv Drug Deliv Rev **69-70**: 29-41.
170. Timmer, T., E. G. de Vries and S. de Jong (2002). "Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?" J Pathol **196**(2): 125-134.
171. Touchman, J. W., I. D'Souza, C. A. Heckman, R. Zhou, N. W. Biggart and E. C. Murphy, Jr. (1995). "Branchpoint and polypyrimidine tract mutations mediating the loss and partial recovery of the Moloney murine

- sarcoma virus MuSVts110 thermosensitive splicing phenotype." J Virol **69**(12): 7724-7733.
172. Turunen, J. J., E. H. Niemela, B. Verma and M. J. Frilander (2013). "The significant other: splicing by the minor spliceosome." Wiley Interdiscip Rev RNA **4**(1): 61-76.
173. Van de Water, N. S., T. Tan, S. May, P. J. Browett and P. Harper (2004). "Factor IX polypyrimidine tract mutation analysis using mRNA from peripheral blood leukocytes." J Thromb Haemost **2**(11): 2073-2075.
174. Vanichkina, D. P., U. Schmitz, J. J. Wong and J. E. J. Rasko (2018). "Challenges in defining the role of intron retention in normal biology and disease." Semin Cell Dev Biol **75**: 40-49.
175. Vega, F. M. and A. J. Ridley (2008). "Rho GTPases in cancer cell biology." Febs Letters **582**(14): 2093-2101.
176. Venables, J. P., R. Klinck, C. Koh, J. Gervais-Bird, A. Bramard, L. Inkel, M. Durand, S. Couture, U. Froehlich, E. Lapointe, J. F. Lucier, P. Thibault, C. Rancourt, K. Tremblay, P. Prinos, B. Chabot and S. A. Elela (2009). "Cancer-associated regulation of alternative splicing." Nat Struct Mol Biol **16**(6): 670-676.
177. Verma, B., M. V. Akinyi, A. J. Norppa and M. J. Frilander (2018). "Minor spliceosome and disease." Semin Cell Dev Biol **79**: 103-112.
178. Wang, B. D. and N. H. Lee (2018). "Aberrant RNA Splicing in Cancer and Drug Resistance." Cancers (Basel) **10**(11).
179. Wang, E. T., R. Sandberg, S. Luo, I. Khrebtkova, L. Zhang, C. Mayr, S. F. Kingsmore, G. P. Schroth and C. B. Burge (2008). "Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes." Nature **456**(7221): 470-476.
180. Wang, G. S. and T. A. Cooper (2007). "Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery." Nat Rev Genet **8**(10): 749-761.
181. Wang, Y., J. Liu, B. O. Huang, Y. M. Xu, J. Li, L. F. Huang, J. Lin, J. Zhang, Q. H. Min, W. M. Yang and X. Z. Wang (2015). "Mechanism of alternative splicing and its regulation." Biomed Rep **3**(2): 152-158.
182. Will, C. L. and R. Luhrmann (2011). "Spliceosome structure and function." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).
183. Wong, J. J., W. Ritchie, O. A. Ebner, M. Selbach, J. W. Wong, Y. Huang, D. Gao, N. Pinello, M. Gonzalez, K. Baidya, A. Thoeng, T. L. Khoo, C. G. Bailey, J. Holst and J. E. Rasko (2013). "Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation." Cell **154**(3): 583-595.
184. Xiao, Q., A. L. Ford, J. Xu, P. Yan, K. Y. Lee, E. Gonzales, T. West, D. M. Holtzman and J. M. Lee (2012). "Bcl-x pre-mRNA splicing regulates brain injury after neonatal hypoxia-ischemia." J Neurosci **32**(39): 13587-13596.
185. Zhang, M. W., K. Fujiwara, X. Che, S. Zheng and L. Zheng (2017). "DNA methylation in the tumor microenvironment." J Zhejiang Univ Sci B **18**(5): 365-372.

186. Zheng, C. L., X. D. Fu and M. Gribskov (2005). "Characteristics and regulatory elements defining constitutive splicing and different modes of alternative splicing in human and mouse." RNA **11**(12): 1777-1787.

SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

INGA
PEČIULIENĖ

Pre-mRNA Splicing Associated with Oncological Diseases: A Study of Splicing Factors and Hypoxic Microenvironment

DOCTORAL DISSERTATION

Natural sciences,
Biology (N 010)

VILNIUS 2020

LIST OF ABBREVIATIONS

A – branching point;
ARE – adenylate-uridylylate-rich elements;
APA – alternative polyadenylation site;
AS – alternative splicing;
ASO – antisense oligonucleotides;
cDNA – complementary DNA
circRNR – circular RNA;
ESE / ISE – exonic / intronic splicing enhancer;
ESS / ISS – exonic / intronic splicing silencers;
Fas – Fas cell surface death receptor;
FasL – Fas ligand;
HIF – hypoxia inducible faktor;
hnRNP – heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPA1, hnRNP K, ect.);
HRE – adenylate-uridylylate-rich elements;
Y – pyrimidine nukleotides;
KHSRP – KH-type splicing regulatory protein;
mRNA – messenger RNA;
PGR – polimerazês grandininê reakcija;
Py – polypyrimidine tract;
Pre-mRNA – primary mRNA transcript;
Rac1 – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1;
Rac1b – Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 isoform b;
RS – domains rich in alternating arginine and serine residues;
RT-PCR – reverse transcription polymerase chain reaction;
RT-qPCR – quantitative reverse transcription PCR;
sFas – soluble Fas cell surface death receptor;
sgRNR – single guide RNA;
snRNP – small nuclear ribonucleoprotein particles (U1, U2, ect.);
SPF45 – 45 kDa splicing factor;
SR – serine / arginine rich proteins (SRSF1, SRSF2, ect.)
U2AF – U2 auxiliary factor;
UTR – untranslated region.

INTRODUCTION

Relevance of the Work

Oncological diseases remain one of the unsolved problems of the entire society as the oncology-related morbidity and mortality has been systematically increasing both in Lithuania and around the world. The discoveries of the last decade have provided a lot of valuable information about oncological processes taking place in the body, but it is clear that our knowledge in this area is still incomplete. Although scientific advances have made it possible to introduce various methods of cancer prevention and diagnosis, we still cannot say that the fight against oncological diseases is effective. As a result, there is constant need for detailed data on pathological changes in important biological processes in the cell. As pre-mRNA splicing is a highly important process in regulating gene expression, it is not surprising that changes in splicing have been observed in many different diseases. Therefore, studies focusing on the expression of disease-associated mRNA isoforms and their regulatory factors remain relevant and provide new information about various pathological processes in cells.

This study describes the research of splicing factors and the expression of tumor-associated mRNA isoforms in healthy and tumor gastrointestinal organ tissues and cell lines derived from these organs' tumors, and examines whether/how hypoxic microenvironment in tumor-derived cell lines affects tumor-associated pre-mRNA splicing changes.

In the development of new strategies for the treatment of oncological diseases, various compounds inhibiting the splicing process or causing changes in mRNA expression are being actively investigated. In the initial phase of research, tumor-derived cell lines are commonly used as a tumor model system. However, successful testing of new anticancer drugs and treatment strategies in cell lines when using 3D cell systems or in the early stages of clinical trials is often unsuccessful: compounds acting on pre-mRNA splicing in cells do not function exactly as in model cell line systems. Unfortunately, the reasons for these differences have not been completely understood yet. Studies in this work have shown differences in the expression of splicing factors and tumor-associated mRNA isoforms in tumor tissues and commonly used cell lines. The results obtained in this work provide valuable information about the processes initiating diseases in various systems.

Analysis of tumor cell genomes has led to significant advances in the development of cancer therapies. Nonetheless, tumor cell resistance to

current treatment remains a major cause of cancer suffering patients' deaths. It is clear that the pathological processes taking place in tumor cells depend not only on the genetic context but also on the effects of the cell microenvironment. Hypoxia is one of the main characteristics of the microenvironment of tumor cells. Decreased oxygen levels in the cellular environment are associated not only with the onset and development of oncological diseases but also with various other diseases, such as infarction, peripheral and coronary artery disease, anemia, pulmonary arterial hypertension, erythrocytosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease. Hypoxic microenvironment in cells is known to cause changes in pre-mRNA splicing, but the mechanism of this process and the factors that regulate this process are unknown. For this reason, studies of hypoxia-dependent pre-mRNA splicing and its regulatory factors remain highly relevant in terms of controlling disease-associated mRNA formation processes.

Aims of the Study:

1. To study the expression of splicing factors and tumors-associated mRNA isoforms in healthy and tumor gastrointestinal organ tissues and to compare the expression of these factors and mRNA isoforms in tumors cell lines.
2. To determine how the reduced oxygen content in the cell environment (hypoxia) affects the expression of tumors-associated mRNA isoforms and to investigate whether the currently known splicing factors in hypoxic cells regulate the formation of these mRNA isoforms.

Specific Tasks of the Dissertation:

1. To compare the expression of splicing factors U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 and KHSRP in healthy and tumor tissues of gastrointestinal tract organs.
2. To compare the formation profiles of tumor-associated Fas and Rac1 mRNA isoforms in healthy and tumor tissues of gastrointestinal tract organs.

3. To compare the expression of splicing factors U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 and KHSRP in cell lines derived from tumors of gastrointestinal tract organs with the expression of factors in HEK 293A cells.
4. To determine the expression profiles of tumor-associated Fas and Rac1 mRNA isoforms in gastrointestinal tract tumor-derived and HEK 293A cell lines.
5. To determine whether hypoxic environmental conditions in tumor cell lines influence the formation of tumor-associated Fas and Rac1 mRNA isoforms.
6. To determine whether/how the hypoxic microenvironment in cell lines alters the expression of splicing factors SPF45 and hnRNP A1.
7. To determine whether splicing factors SPF45 and hnRNP A1 regulate Fas pre-mRNA alternative splicing in hypoxic cells.

Scientific Novelty and Practical Importance of the Thesis

This study analyzes the changes in the expression of tumors-associated mRNA isoforms and investigates the genetic and micro environmental factors causing these changes.

Detailed studies of tumors-associated Fas and Rac1 mRNA isoforms formation and splicing regulating factors U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 and KHSRP expression in healthy and tumor tissues of gastrointestinal tract organs and in tumor-derived cell lines have been performed. Various expression profiles of splicing factors and tumors-associated mRNA isoforms identified in this work have shown that tumor-derived cell lines differ from both healthy and tumor tissues. These results confirm that cell lines, as a model system, do not fully reflect all the biological processes which take place in tumor. The newly obtained data explains why successful trials of anti-cancer drugs or treatment strategies in cell lines often fail to be approved in the early stages of clinical trials. This study identified the characteristic expression of various splicing factors in individual tumor types; therefore, U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2, and KHSRP factors can be used as potential differential diagnostic markers.

The current research describes the study of mRNA expression dependent on reduced oxygen content in the environment (hypoxia) and the factors regulating this process. The obtained results show that the hypoxic microenvironment changes the expression of Fas mRNA isoforms in cell lines derived from gastrointestinal tumors, but the expression of Rac1 mRNA isoforms is independent of hypoxia. To date, no such data has been available in the literature. It has also been shown that splicing factors SPF45 and hnRNP A1 do not regulate the formation of Fas gene mRNA isoforms under hypoxic conditions. These results provide new insights into the understanding of the influence of the hypoxic microenvironment of cells on the expression of tumor-associated mRNA formation. By using this knowledge, it will be possible to create conditions in cell model systems which are similar to the microenvironment which exists in tumors. Only a correctly chosen model system for the initial research is the basis for successful new anticancer therapies. Taken together, these findings are also highly valuable in order to control the processes of disease-associated mRNA formation and thus prevent the development of various pathological processes.

Defended Statements of the Scientific Work:

1. The expression of splice factors SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 and KHSRP in pancreatic, colon and gastric tumors compared to healthy tissues varies.
2. The expression of anti-apoptotic sFas and Rac1b mRNA isoforms is increased in the studied tumors compared to healthy tissues.
3. The expression of splicing factors SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 and KHSRP in all studied gastrointestinal tumors-derived cell lines, compared to their expression in HEK 293A cell line, varies.
4. The expression of tumor-associated Fas and Rac1 mRNA isoforms in gastrointestinal tumors-derived cell lines does not correlate with the expression profile of these mRNA isoforms found in tumors.
5. Changes in the levels of cellular oxygen tension in tumors-derived cell lines alter the expression of Fas mRNA isoforms, but the expression of Rac1 mRNA isoforms does not depend on the amount of oxygen in the cell environment.
6. The expression of splicing factors SPF45 and hnRNP A1 in the studied cell lines does not depend on the environmental oxygen concentration changes.
7. Splicing factors SPF45 and hnRNP A1 do not regulate the altered Fas pre-mRNA splicing in the hypoxic cells.

MATERIALS AND METHODS

Tumor and healthy tissues

The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, and that the study conforms to The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). Patients had neither undergone chemotherapy nor radiotherapy prior to surgery. The tumor cell cellularity was at least 80% in all samples.

Primary pancreatic tumor samples were surgically obtained from patients who underwent resection for pancreatic cancer. All of the samples were obtained from the T3 tumors (according to TNM classification). All of the samples were pancreatic ductal adenocarcinomas as confirmed by the final pathological report. All of the samples were moderately (G2) – poorly differentiated (G3) as per the guidelines of the American Joint Commission on Cancer. Control (non-cancerous) pancreatic tissue samples were obtained from healthy donors during the multiorgan donor explantation procedures.

Samples of colon cancer were obtained during the surgery of colon cancer. Patients with rectal cancer were excluded from the study. Final histopathological report stated that they were adenocarcinomas of the colon (T3 according to TNM classification) with moderate to poor differentiation grade (G2-G3). Control (non-cancerous) tissues of the colon were obtained from patients with benign diseases of the colon (diverticulitis etc.) during routine resection procedures of the colon.

Gastric cancer tissue samples were obtained during the surgery for gastric cancer. They were all poorly differentiated (G3) adenocarcinomas. Control (healthy) tissue of the stomach was obtained during the bariatric surgery as a routine resection procedure. Tissue was not affected by any disease.

Cell culture maintenance *in vitro*

Cells were cultivated as monolayer in DMEM (Gibco) or McCoy's 5A (1x) media (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biochrom), 100 IU/ml penicillin (Biochrom) and 100 µg/ml streptomycin (Biochrom) at 37°C in humidified 5% CO₂ conditions and exposed to normoxia (21% O₂) or hypoxia (24h, 1% O₂ in an *Invivo200* hypoxic workstation (Ruskin Technologies))

RT-PCR and quantitative real time PCR

Total RNA from cell lines was isolated using Quick-RNA™ MiniPrep kit (*Zymo Research*) and cDNA was synthesized using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (*ThermoFisher Scientific*) using random hexamer primers. PCR from obtained cDNA was performed using Mastercycler personal thermal cycler (*Eppendorf*). 18S RNA was used as a loading control.

Proteins and total RNA from healthy and tumor tissues were prepared using *mirVANATM PARISTM Protein and RNA Isolation System* (*Life Technologies*) kit according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real time PCR was carried out using SYBR Green qPCR Master Mixes (*ThermoFisher Scientific*). The amount of each type of qPCR product was normalized against β -actin. The qPCR primers were designed for individual Fas and sFas mRNA isoform amplification.

Western blot

Whole cell lysates were separated using 12% SDS-PAGE, transferred on nitrocellulose membrane (*GE Healthcare Life science*) and blotted with appropriate primary and secondary mouse (*Dako*, P 0447) or rabbit (*Dako*, P 0448) antibodies. The following primary antibodies were used: anti-Fas (*Abcam*, ab133619), anti - RBM17 (*Abcam*, ab204333); anti - hnRNPA1 (*Abcam*, ab177152); anti-HIF1 α (*BD transduction laboratories*, 610959); anti β -actin (*Abcam*, ab3280) anti-SFRS2 (*Abcam*, ab28428), anti-SFRS1 (*Abcam*, ab38017), anti-U2AF35 (*Abcam*, ab172614), anti-KHSRP (*Abcam*, ab150393), anti-actin (*Abcam*, ab3280), anti-U2AF65 (*Santa Cruz Biotechnology*, sc-53942).

Reduction of cellular protein levels using CRISPR/Cas9 system

Cas9 expression vector (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)) for human HCT 116 transfection were obtained from Addgene (Addgene no 62988). Synthesized oligos for sgRNA expression were denatured at 95 °C for 5 min and annealed at room temperature before being cloned between two BpiI sites of linearized Cas9-sgDNA expression vector. Specific target sequences for SPF45 and hnRNPA1 gene editing were selected using CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>). All CRISPR/Cas9 targeting experiments were performed with HCT 116 human

colorectal carcinoma cell line. For targeting individual genes, cells were seeded at 8×10^4 cells per well of 12-well plate in complete McCoy's 5A (1x) media and transfected with constructed Cas9-sgRNA or empty Cas9 plasmid (containing no sgRNA) using jetPrime DNA transfection reagents (Polyplus) according to the manufacturers' instructions. 72 h post transfection cells were treated with puromycin (2 $\mu\text{g/ml}$), diluted, and plated in to 96 well plate (1 cell/ well). Cells were returned to the incubator and allowed to expand for 2 – 3 weeks. Target protein reduced expression containing single cell colonies were identified by Western Blotting.

RESULTS

Gastrointestinal Tract Tumors and Cell Lines Possess Differential Splicing Factor Expression and Tumor-Associated mRNA Isoform Formation Profiles

Recent analyses have shown that there are correlations between the expression of splicing regulatory factors and alternative splicing transitions associated with malignant transformation (1, 2). Cell lines derived from human tumors have been extensively used as experimental models of neoplastic disease (3). Yet, such cell lines differ from both normal and cancerous tissues. The data obtained from widely used DNA and RNA microarray systems does not give full information about protein expression levels in cells and tissues. Thus, it is crucial to experimentally compare and validate similarities and differences in protein and mRNA expression levels between tissues and in the cell lines widely used in cancer research.

Splicing factors expression in colon, gastric and pancreas tumors

In order to experimentally evaluate the expression of five splicing factors (U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 and KHSRP) in tumors, the expression of selected splicing factors in colon, gastric and pancreas tumors was analyzed and compared to healthy tissues. In total, 29 healthy and 40 tumor tissues were used for studies (Table 1).

Since changes in tissues might be systemic and may affect a cancerous tissue as well as a relatively healthy tissue adjacent to it, we have performed our comparison of the cancerous tissue with a healthy donor's tissue. The obtained results show that the tested splicing factor expression levels in various tumors, compared to healthy tissues, actually differ (Table 2).

SRSF2 protein expression did not show any changes in pancreatic and colon tumors compared to its expression in healthy tissues. A slight reduction (1.4 ± 0.3 times lower frequency) of KHSRP expression and highly reduced SRSF2 expression (up to 7-fold) was observed in gastric tumors.

Table 1. Distribution of the sample of healthy and tumor tissues used for studies

Tissues	Healthy	Tumor
<i>Pancreas</i>	8	12
<i>Gastric</i>	15	14
<i>Colon</i>	6	14
Total:	29	40

Table 2. Expression of splicing factors in pancreas, colon and gastric tumors compared to healthy tissues

Organ	Splicing factors				
	SFRS2	SFRS1	U2AF35	U2AF65	KHSRP
<i>Pancreas</i>	-1.1 ± 0.4	-13.5 ± 0.3	-3.6 ± 0.3	+2.1 ± 0.3	-1.4 ± 0.4
<i>Colon</i>	-1.1 ± 0.3	-1.4 ± 0.2	-3.2 ± 0.1	-1.3 ± 0.4	-1.3 ± 0.2
<i>Gastric</i>	-7.0 ± 0.3	-1.6 ± 0.1	+2.3 ± 0.5	-1.9 ± 0.3	-1.4 ± 0.4

(-) coefficient of expression reduction compared to healthy tissues; (+) coefficient of expression increase compared to healthy tissues; the value of splicing factors expression in the healthy tissues was set as 1

SRSF1 protein expression was slightly reduced in gastric and colon tumors (1.6±0.1 and 1.4±0.2 times lower frequency, respectively), whereas the value was highly reduced (up to 13.5-fold) in pancreatic tumors. The expression of individual subunits of heterodimeric splicing factor U2AF in various types of tumors is different, which shows that the expression levels of each subunit *do* probably play an important separate role in tumor-associated pre-mRNA splicing regulation. Enhanced (2.1±0.3-fold) 65 kDa subunit expression was observed in pancreatic tumors, while 1.3±0.4 and 1.9±0.3-fold reduction in the expression was observed, respectively, in colon and gastric tumors. More than 3-fold reduced expression of 35 kDa subunit was found in pancreatic and colon tumors, while in gastric tumors its expression was enhanced up to 2.3-fold.

Splicing factors expression in colon, gastric, kidney and pancreas cell lines

The expression of the same splicing factors was analyzed in cell lines derived from colon, gastric, kidney and pancreas tumors. In order to elucidate how the expression of the splicing factors varies in cell lines derived from the same organ, three pancreatic carcinoma (Panc-1, Su.86.86 and T3M4), two kidney carcinoma (CaKi-1 and 786-0), one gastric carcinoma (KATOIII), and one colon carcinoma (HCT116) cell lines were used for splicing factor expression studies (Table 3). Human embryonic kidney HEK 293A cell line was chosen as a reference point for expression comparison.

Lower variation in individual factor U2AF subunit protein expression levels was observed in cell lines compared to their expression in tumors. 65 KDa subunit lowest expression found in HCT116 cells and in KATO III cells, while, in other tested cell lines, its expression was reduced by 1.4–1.8 times. Low U2AF35 protein expression differences detected in SU.86.86

Table 3. Expression of splicing factors in pancreas, kidney, colon and gastric cell lines. Embryonic kidney 293A cell line was used as the reference point

Organ	Cell line	Splicing factors				
		SFRS2	SFRS1	U2AF35	U2AF65	KHSRP
<i>Pancreas</i>	PANC-1	-2.1 ± 0.1	-1.4 ± 0.1	-1.5 ± 0.0	-1.7 ± 0.0	-1.5 ± 0.3
	SU.86.86	-1.7 ± 0.1	-1.7 ± 0.3	-1.2 ± 0.1	-1.5 ± 0.1	-1.4 ± 0.1
	T3M4	-1.6 ± 0.0	-1.8 ± 0.2	-1.3 ± 0.1	-1.4 ± 0.0	-1.5 ± 0.1
<i>Kidney</i>	CaKi-1	-1.5 ± 0.2	-1.1 ± 0.2	-1.7 ± 0.2	-1.6 ± 0.1	-1.4 ± 0.1
	786-O	-1.3 ± 0.1	-1.3 ± 0.3	-1.8 ± 0.0	-1.6 ± 0.2	-1.3 ± 0.1
<i>Colon</i>	HCT116	-2.6 ± 0.0	-1.5 ± 0.2	-1.4 ± 0.0	-1.3 ± 0.1	-1.4 ± 0.1
<i>Gastric</i>	KATOIII	-1.4 ± 0.3	-1.2 ± 0.1	-1.6 ± 0.0	-1.2 ± 0.1	-1.1 ± 0.3

(-) coefficient of reduced expression compared to HEK 293A cells; (+) coefficient of enhanced expression compared to HEK 293A cells; the value of splicing factors expression in the healthy tissues was set as 1

cells, while, in other tested cell lines, its expression was reduced by 1.3–1.8 times. We have not established enhanced expression of individual subunits of U2AF factor among cell lines. SR protein, SRSF1 and SRSF2 expression analysis, compared to their expression in reference HEK 293A cells, showed that the expression of SRSF2 protein was reduced by 1.3–2.6 times in all the tested cell lines. The highest reduction of expression – up to 2.6 times – was established in colon carcinoma HTC116 cells. We found no changes in SRSF1 expression in CaKi-1 cells, while, in the other tested cell lines, its expression, compared to HEK 293A cells, was reduced by 1.2–1.8 times. There was no difference in KHSRP expression in KATO III cells (compared to HEK 293A cells), while, in the other tested cell lines, the expression of this factor was reduced by 1.3–1.5 times.

The obtained results have shown that the expression of the tested splicing factors in HEK 293A cells is higher compared to the other tested cell lines. We never observed more than 2 times higher values compared to those established in tumors in terms of the splicing factor expression variation among cell lines derived from the same organ and among the cell lines derived from different organs.

Fas and Rac1 mRNA isoforms expression profiles in healthy tissues and colon, gastric and pancreas tumors

We further investigated whether the tumor-associated mRNA isoform of Fas and Rac1 genes in cell lines is similar to that observed in tumors. Fas and Rac1 genes were selected for the experiment due to tumor-specific sFAS and Rac1b mRNAs generated during alternative splicing, from which, the synthesized proteins increase the resistance of tumor cells to apoptosis, cytoskeleton rearrangements, migration and proliferation (4,5). The obtained

results from Fas and Rac1 gene tumor-associated mRNA isoform formation show that, in different tumors, they are expressed differently (Table 4 and 5). Pancreatic tumors showed a 10% increase in sFas mRNA levels (for sFas/Fas, healthy: 0.2/0.8; tumor: 0.3/0.7), whereas no changes in Rac1b mRNA isoform levels (for Rac1b/Rac1, healthy: 0.2/0.8; tumor: 0.2/0.8) were detected. In gastric tumors, we found only a slight increase in sFas mRNA isoform level (for sFas/Fas, healthy: 0.25/0.75; tumor: 0.3/0.7), while approximately a 10% increase in tumorigenic Rac1b mRNA isoform level (for Rac1b/Rac1, healthy: 0.1/0.9; tumor: 0.2/0.8) was detected. Colon tumors showed a 20% level of enhancement in sFas (for sFas/Fas, healthy: 0.1/0.9; for tumor: 0.3/0.7), and a 10% increase in Rac1b was detected (for Rac1b/Rac1, healthy: 0.1/0.9; tumor: 0.2/0.8) tumorigenic mRNA isoform.

Table 4. Fas mRNA tumor associated isoform expression profiles in colon, gastric and pancreas healthy tissues and tumors

Organ	Genes			
	<i>Fas</i>			
	Fas mRNA		sFas mRNA	
	<i>Healthy</i>	<i>Tumour</i>	<i>Healthy</i>	<i>Tumour</i>
<i>Pancreas</i>	0.8±0.04	0.7±0,03	0.2±0,04	0.3±0,03
<i>Colon</i>	0.9±0.07	0.7±0,06	0.1±0,07	0.3±0,06
<i>Gastric</i>	0.7±0.04	0.7±0,03	0.3±0,04	0.3±0,03

Total Fas mRNA was accounted as 1

Table 5. Rac1 mRNA tumor associated isoform expression profiles in colon, gastric and pancreas healthy tissues and tumors

Organ	Genes			
	<i>Rac1</i>			
	Rac1 mRNA		Rac1b mRNA	
	<i>Healthy</i>	<i>Tumour</i>	<i>Healthy</i>	<i>Tumour</i>
<i>Pancreas</i>	0.8± 0.08	0.8± 0.04	0.2± 0.08	0.2± 0.04
<i>Colon</i>	0.9± 0.03	0.8± 0.06	0.1± 0.03	0.2± 0.06
<i>Gastric</i>	0.9± 0.05	0.8± 0.05	0.1± 0.05	0.2± 0.04

Total Rac1 mRNA was accounted as 1

Fas and Rac1 mRNA isoforms expression profiles in colon, gastric, kidney and pancreas cell lines

As the next step, we investigated whether the tumor-associated mRNA isoform of Fas and Rac1 genes in cell lines is similar to that observed in tumors. Our Fas and Rac1 mRNA isoform analysis showed that cancer-associated sFas and Rac1b isoforms are differently expressed in tested tumor-derived cell lines (Table 6). The lowest amount of sFas isoform was detected in Su.86.86, T3M4 and Panc-1 cells (sFas/Fas: 0.1/0.9), while the highest amount was detected in 786-0 and HCT116 cells (sFas/Fas: 0.4/0.6

and 0.35/0.65, respectively). In the other cell lines, the ratio between sFas/Fas mRNA isoform formation was between 0.1–0.2/0.9–0.8, respectively. Relatively high sFas mRNA isoform amount was detected in HEK293A cells (sFas/Fas: 0.3/0.7). The highest expression of tumor-associated Rac1b mRNA isoform was detected in Panc-1 cells (Rac1b/Rac1: 0.2/0.8). In all other tested cell lines, the amount of Rac1b isoform was lower (Rac1b/Rac1: 0.07–0.1/0.95–0.87). Also, high amounts of tumor-associated Rac1b isoform were detected in HEK293A cells (Rac1b/Rac1: 0.2/0.8).

The results show that the expression levels of tumor-associated sFas and Rac1b mRNA isoform levels in cancer cell lines do not correspond to the levels established in tumors. An exception might be sFas mRNA levels in colon carcinoma HTC116 cells which correspond to the levels observed in colon tumors. The observed differences in tumor-associated mRNA isoform levels between tumors and cell lines may, for different systems, reflect specific splicing factor expression differences.

Table 6. Fas and Rac1 tumor-associated mRNA isoform expression profiles in colon, gastric, kidney and pancreas cell lines

Organ	Cell line	Gene			
		Fas		Rac1	
		Fas mRNA	sFas mRNA	Rac1 mRNA	Rac1b mRNA
<i>Pancreas</i>	PANC-1	0.9 ± 0.08	0.1 ± 0.08	0.8 ± 0.07	0.2 ± 0.07
	SU8686	0.9 ± 0.10	0.1 ± 0.10	0.9 ± 0.04	0.1 ± 0.04
	T3M4	0.9 ± 0.08	0.1 ± 0.08	0.9 ± 0.05	0.1 ± 0.05
	Capan-1	0.8 ± 0.08	0.2 ± 0.08	0.9 ± 0.02	0.1 ± 0.02
<i>Embryonic kidney</i>	HEK- 293	0.7 ± 0.08	0.3 ± 0.08	0.8 ± 0.02	0.2 ± 0.02
<i>Kidney</i>	786-O	0.6 ± 0.06	0.4 ± 0.06	0.9 ± 0.02	0.1 ± 0.02
	CaKi-1	0.8 ± 0.08	0.2 ± 0.08	0.9 ± 0.01	0.1 ± 0.01
<i>Gastric</i>	KATOIII	0.8 ± 0.05	0.2 ± 0.05	0.9 ± 0.03	0.1 ± 0.03
<i>Colon</i>	HCT116	0.7 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.9 ± 0.03	0.1 ± 0.03

Total Fas and Rac1 mRNA was accounted as 1

Hypoxia alters splicing of cancer-associated Fas gene

Hypoxia is one of the main characteristics of the microenvironment of solid tumor cells. Recent studies have revealed that tumor genesis and hypoxia involve large-scale alterations in alternative pre-mRNA splicing. For this reason, studies of hypoxia-dependent pre-mRNA splicing and its regulatory factors remain highly relevant in terms of controlling disease-associated mRNA formation processes (3-5).

Alternative Fas pre-mRNA splicing in different cell lines is hypoxia dependent

Alternative Fas pre-mRNA splicing provides potentially important means by which tumor cells avoid apoptosis in their hostile microenvironment. (6-8). Fas pre-mRNA is alternatively spliced (Fig. 1, A). Therefore, we have raised the question whether hypoxia could be the factor triggering changes in alternative Fas pre-mRNA splicing which promotes anti-apoptotic sFas mRNA isoform formation. Initially, for our studies, we used HCT116 cells cultivated either under normoxic (21% O₂), or under hypoxic (1% O₂) conditions. Under hypoxia, a shift in alternative Fas pre-mRNA splicing emerged, which led to more abundant sFAS product and less abundant FAS product formation (Fig. 1, B and C, lane 2). Such results indicate that, in HCT116 cells, Fas pre-mRNA alternative splicing is regulated by hypoxia, in other words, it is hypoxia-dependent.

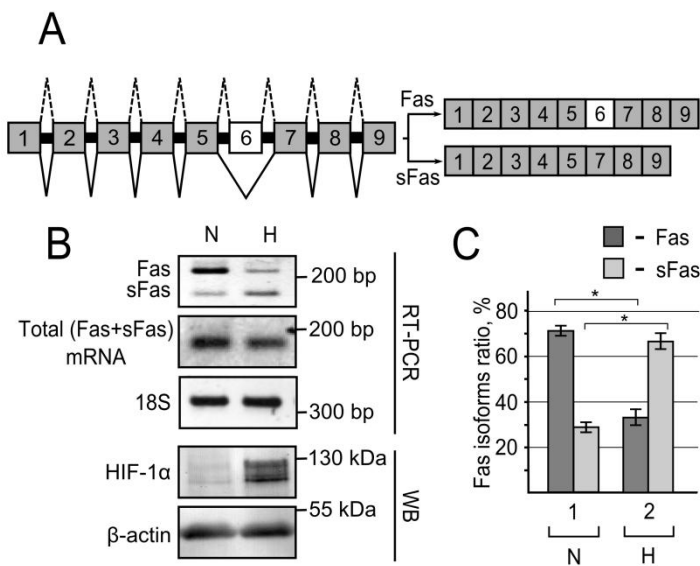


Figure 1. FAS pre-mRNA alternative splicing in HCT116 cells is regulated by hypoxia. A – Schematic representation of FAS pre-mRNA and alternatively spliced FAS and sFAS mRNA isoforms. B – Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) results of Fas and sFas isoform mRNA profile and total (Fas + sFas) mRNAs expression in HCT116 cells cultivated under normoxic (21% O₂) (N) and hypoxic (1% O₂) (H) conditions. For Fas and sFas mRNA isoform detection, the primer pair used in PCR was located in exon 5 and exon 7. 18S RNA was used as PCR loading control. To verify the hypoxic conditions in the cells, HIF-1α protein was detected, and β-actin was used as a protein loading control. C – Quantification of the Fas and sFas mRNA isoform relative ratio from normoxic (lane 1) or hypoxic (Lane 2) cells. The data represents means±SD from at least five independent experiments, *p<0.05

The following step in our research was to investigate whether hypoxia-dependent changes in Fas alternative pre-mRNA splicing are characteristic of the HCT116 cell line, or they also appear in other cell lines. A set of cell lines derived from various human organs, such as colon (COLO 205), stomach (KATO III), kidney (Caki-1), embryonic kidney (HEK 293A), pancreas (T3M4), cervix (HeLa) and lung (A549) were tested. RT-PCR analysis showed a clearly visible increase in sFas mRNA isoform formation induced by hypoxia in HEK 293A, T3M4, HeLa and A549 cell lines (Fig. 2, A, Lanes 9–16). In order to verify RT-PCR results in the tested cell lines, quantitative real time qPCR analysis (RT-qPCR) was performed (Fig. 2, B).

To facilitate separate detection of these two variants of FAS mRNA, primers which allowed individual amplification of each isoform were designed. RT-qPCR result analysis confirmed a hypoxia-specific increase in sFas mRNA isoform formation across all the cell lines (Fig. 2, B).

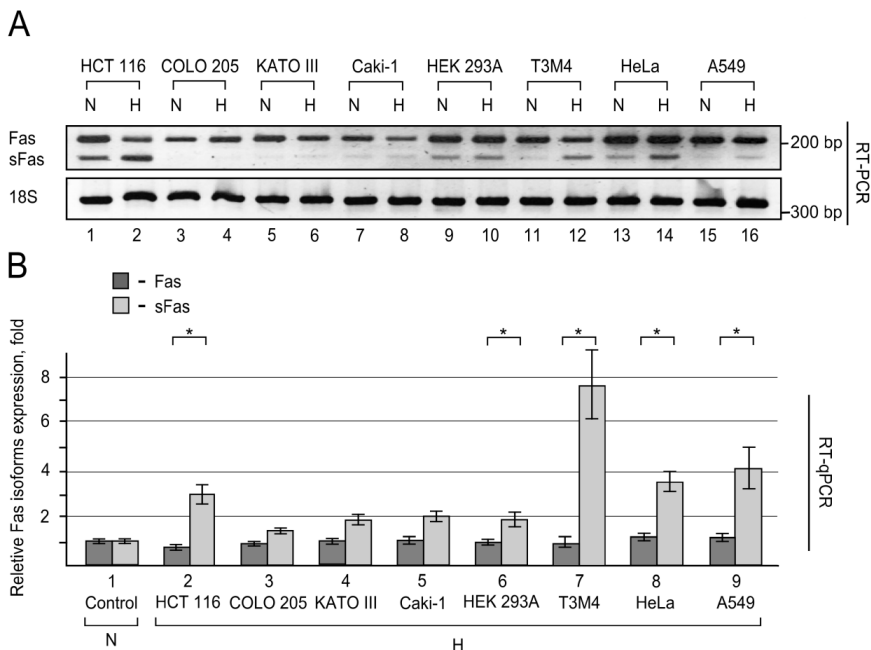


Fig. 2. Hypoxia changes Fas pre-mRNAs alternative splicing in a set of cell lines. A – RT-PCR results of Fas and sFas mRNA isoform profiles in different cell lines cultivated under normoxic (21% O₂) (N) or hypoxic (1% O₂) (H) conditions. B – Fas and sFas mRNA isoform expression profile using reverse transcriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analysis. RT-qPCR results were normalized to each individual β -actin value. Normoxic expression levels of FAS and sFAS mRNA were set as 1 for each tested cell line (Lane 1 – control lane). Hypoxic FAS and sFAS mRNA expression levels were compared to the control sample and visualized in one plot. The data represents means \pm SD from at least five independent experiments performed in triplicates, * p <0.05

An especially high increase level in sFas mRNA formation was observed in HCT116 (3-fold), T3M4 (7.7-fold), HeLa (3.6-fold) and A549 (4.4-fold) cells (Fig. 2, B, lanes 2, 7, 8 and 9).

Rac1 pre-mRNA alternative splicing is hypoxia-independent

Subsequently, we raised a question whether hypoxia induces changes in alternative splicing of other cancer-associated genes. We chose to analyze Rac1 pre-mRNA alternative splicing (Fig. 3, A) since Rac1b mRNA isoform is produced by alternative pre-mRNA splicing, and Rac1b protein expression is enhanced in tumors (9). For this experiment, HCT116, HeLa, A549 and

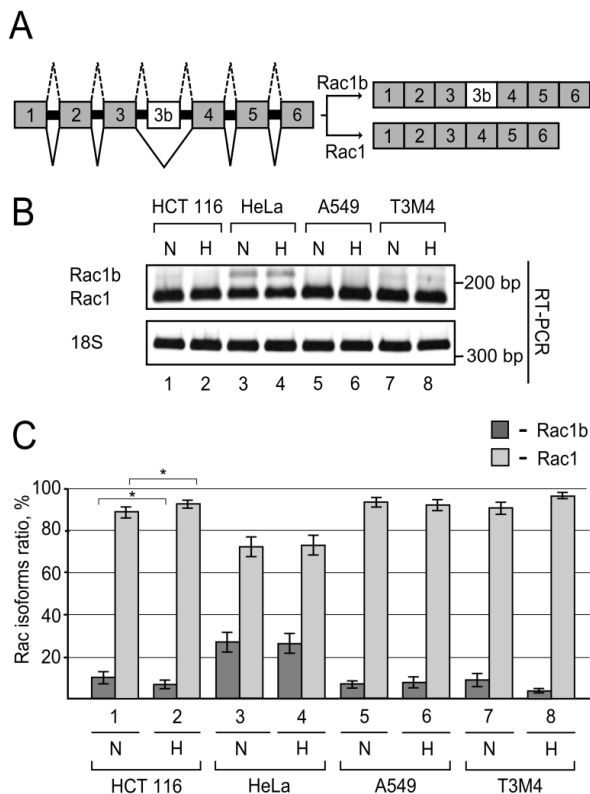


Fig. 3. Hypoxia does not change Rac1 pre-mRNAs alternative splicing. A – Schematic representation of Rac1 pre-mRNA and two alternatively spliced mRNA isoforms (Rac1 and Rac1b). B – RT-PCR results of Rac1 and Rac1b mRNA isoform profiles in HCT116, HeLa, A549 and T3M4 cells cultivated under normoxic (21% O₂) (N) or hypoxic (1% O₂) (H) conditions. C – Quantification of Rac1 and Rac1b mRNA isoform relative ratio changes (N – in normoxic cells; H – in hypoxic cells). Total Rac1 pre-mRNA was set at 100%. The data represents means±SD from at least three independent experiments, *p<0.05

T3M4 cell lines were chosen as they had the most evident hypoxia-dependent changes in Fas alternative pre-mRNA splicing. RT-PCR analysis revealed that hypoxic conditions did not have any influence on Rac1 alternative mRNA isoform formation (Fig. 3, *B* and *C*).

Hypoxia reduces Fas protein levels across different cell lines

The fact that, under hypoxic conditions, alternative Fas splicing is shifted towards sFas mRNA isoform production raised the question if the membrane bound levels of the Fas protein are also affected by hypoxia. For this study, we used four cell lines (HCT116, HeLa, A549 and T3M4), in which, the highest increase in sFas mRNA formation under hypoxic conditions was detected. Western blot analysis with anti-Fas antibody showed that hypoxia reduces membrane bound Fas protein levels across all the tested cell lines (Fig. 4, *A* and *C*). The reduction of the Fas protein level in hypoxic cells correlates with the observed changes in Fas pre-mRNA alternative splicing.

SPF45 and hnRNPA1 protein expression in hypoxic cells does not correlate with changes in Fas pre-mRNA splicing

SPF45 and hnRNPA1 proteins are known to be involved in many different pre-mRNAs alternative splicing regulations (10,11). These factors also were identified as proteins, in the dose-dependent manner, regulating alternative Fas pre-mRNA splicing in normoxic cells (12-14). We raised the hypothesis that these specific splicing factors could be the major players in hypoxia-dependent Fas pre-mRNA alternative splicing regulation. For such studies, HCT116, HeLa, A549 and T3M4 cells were used. A comparison of SPF45 expression analysis using anti-SPF45 antibody in cells cultivated under normoxic or hypoxic conditions revealed that hypoxic conditions differently change protein expression in the tested cell lines. A slight decrease in SPF45 protein expression was detected in HCT116 and A549, and a small increase of expression was observed in T3M4 cells (Fig. 4, *B* and *D*). Similar results were obtained when anti-hnRNPA1 antibody was used for hnRNPA1 cellular expression analysis (Fig. 4*B* and 4*E*).

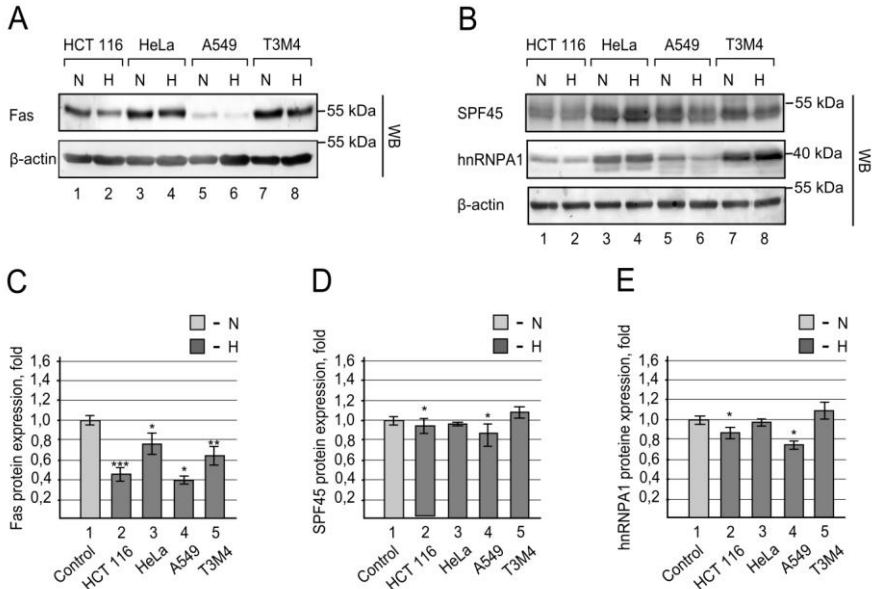


Fig. 4. Fas, SPF45 and hnRNPA1 protein expression comparison between normoxic and hypoxic HCT116, HeLa, A549 and T3M4 cells. A – Western blot showing Fas protein expression levels in normoxic (21% O₂) (N) and hypoxic (1% O₂) (H) cells. B – Comparison of SPF45 and hnRNPA1 protein expression levels in normoxic (N) and hypoxic (H) cells by using the Western blot method. Quantification of C – Fas, D – SPF45 and E – hnRNPA1 protein expression between normoxic and hypoxic HCT116, HeLa, A549 and T3M4 cells. Protein expression in normoxia was set to 1 (Lane 1 – control lane). Lanes 2, 3, 4 and 5 represent protein expression changes in hypoxia-treated HCT116, HeLa, A549 and T3M4 cells, respectively, when compared to the control sample. Actin was used as the loading control. The data represents means±SD from at least three independent experiments, ***p<0.005; **p<0.01; *p<0.05

Reductions of SPF45 and hnRNPA1 cellular protein levels in HCT 116 cells do not influence Fas pre-mRNA splicing

In order to test whether a greater reduction of SPF45 and hnRNPA1 cellular expression would have any influence on Fas pre-mRNA alternative splicing in hypoxic cells, a CRISPR/Cas9 system was used (Fig. 5A and 5B). Endogenous Fas pre-mRNA splicing analysis showed that the reduction of splicing factor SPF45 cellular protein level did not affect Fas and sFas mRNAs formation ratio in CRISPR-SPF45-treated cells cultured either under normoxic or hypoxic conditions (Fig. 5A and 5C). A reduction of the splicing factor hnRNPA1 cellular protein level had no effect on Fas pre-mRNA alternative splicing in hypoxic cells, either (Fig. 5B and 5D).

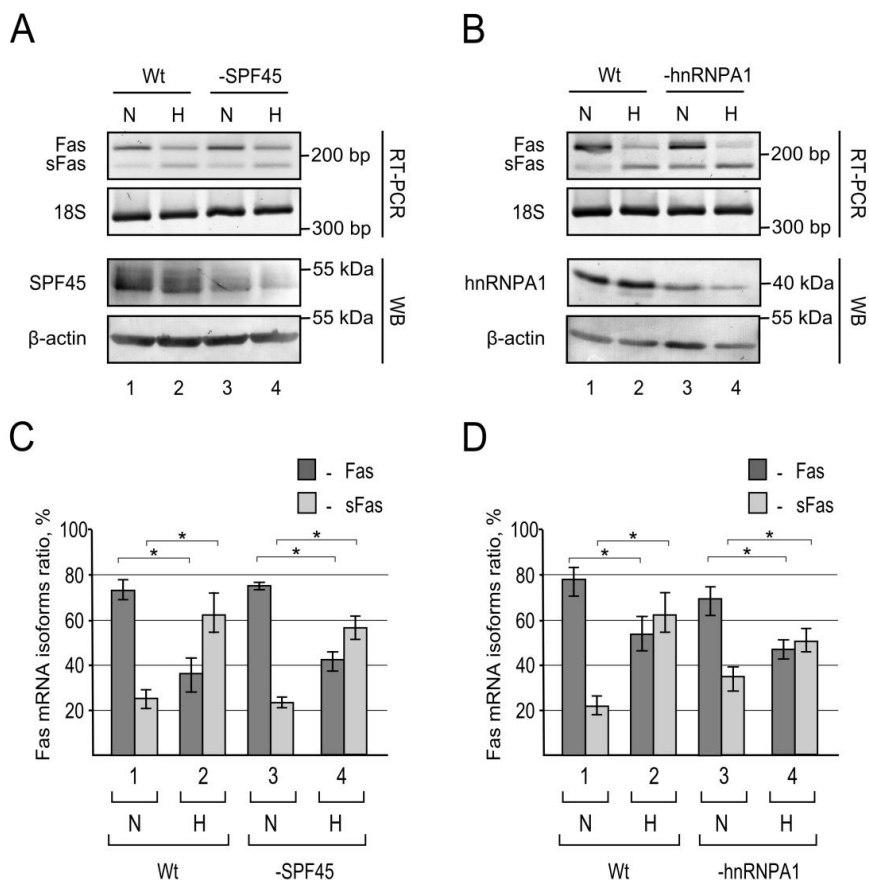


Fig. 5. Reduction of SPF45 and hnRNPA1 cellular protein levels does not influence Fas pre-mRNA alternative splicing. A – Upper panel: RT-PCR results showing Fas and sFas isoform mRNA profiles in normoxic (21% O₂) (N) and hypoxic (1% O₂) (H) wild type and CRISPR–SPF45-treated HCT116 cells; Lower panel: SPF45 protein expression comparison between wt and CRISPR–SPF45-treated HCT116 cells. B – Upper panel: RT-PCR results showing Fas and sFas mRNA isoform profiles in wild type cells and CRISPR–hnRNPA1-treated HCT116 cells; Lower panel: hnRNPA1 protein expression comparison between wt and CRISPR–SPF45-treated cells. 18S RNA and β-actin were used as loading controls. Quantification of Fas and sFas mRNA isoform relative ratio changes in C – wt and CRISPR – SPF45 or D – CRISPR–hnRNPA1 treated cells. The data represents means±SD from at least three different mutant cell lines and three independent experiments, *p<0.05

DISCUSSION

Deep sequencing analysis of RNA allowed the detection of multiple pre-mRNA splicing changes in the cells. This data underscores once again that pre-mRNA splicing is a vital process which helps cells adapt to changing environmental conditions (1,15). Altered expression of mRNA isoforms has been identified in a variety of tumors. The splicing pattern of specific isoforms of numerous genes is altered as cells move through the oncogenic process of gaining proliferative capacity while acquiring angiogenic, invasive, anti-apoptotic and survival properties (16).

In this study, we analyzed the protein expression of splicing factors U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 and KHSRP in healthy and tumorous gastrointestinal organ tissues. The study showed that, in gastrointestinal tumors, the expression of splicing factors varies compared to healthy tissues. The obtained data also corroborates the results presented in the literature: studies performed by several different groups of scientists on breast, prostate, brain, intestine, etc. tumors also showed changes in the expression of various splicing factors (17,18).

In this work, we have shown that the expression of splicing factors SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 and KHSRP in pancreatic, colon and gastric tumors decreased from 1.3 to 13.5 times compare to healthy tissues. The expression of splicing factors U2AF35 and U2AF65 in gastric and pancreatic tumors increased 2-fold. This data could be useful in the differential diagnosis of gastric, pancreatic, and colon tumors.

Cell lines derived from various tumors represent a model system widely used in experiments, especially in fundamental cancer biology and primary drug testing studies. However, in clinical studies, some of the results obtained in cell lines are not confirmed (19,20). It raises a question whether cell lines are a suitable model system for the study of complex ontogenesis' processes. Unfortunately, virtually total lack of data describing the similarities and differences between tumors and their derived cell lines is observed. In this study, a decrease in the splicing factor expression was observed in all the tested cell lines compared to the non-cancerous HEK 293A cell line. These results are consistent with the data obtained by us in gastrointestinal tumor tissues which also showed a decrease in the expression of splicing factors. On the other hand, the expression of some splicing factors found in the tissues of gastrointestinal tumors manifested a decrease of up to 13 times. Meanwhile, the decrease in the expression of splicing factors detected in the cell lines derived from the same tumors is

only 2.6 times, and it does not correlate with the results determined in the cell lines. The obtained data shows that the cell lines as a model system do not fully reflect all the biological processes taking place in tumors.

Some publications suggest that changes in the expression of splicing factors often lead to changes in the ratio of the formed mRNA isoforms. Altered expression of mRNA isoforms was also found in tumors and other pathological stages of the body (21,22). We analyzed pre-mRNA splicing of cancer-associated Fas and Rac1 genes in gastrointestinal healthy and tumor tissues as well as in cell lines derived from these tumors. This study revealed that Fas and Rac1 pre-mRNA splicing in tumors varied if compared to healthy tissues. The data showed an increase in the expression of tumor-specific sFas and Rac1b mRNA isoforms. These results correlate with the results presented in the literature: an increased expression of sFas and Rac1b mRNA isoforms was found in various tumors (23-25).

As the next step, we compared the data of sFas/Fas and Rac1b/Rac1 mRNA expression ratios obtained in tumors and in cell lines. Comparative analysis showed that the expression of sFas and Fas mRNA isoforms in tumors and cell lines differed. Specifically, the expression of Fas gene mRNA in cell lines derived from gastrointestinal tumors is more similar to that of mRNA isoforms found in healthy tissues rather than in tumors. However, a comparison of the expression of Rac1 gene mRNA isoforms revealed that the expression of Rac1b and Rac1 isoforms in cell lines is more similar to that of the same mRNA isoforms found in tumors.

A comparison of the expression of splicing factors and mRNA isoforms in healthy tissues, cancerous tissues and tumor-derived cell lines demonstrate that the tumor is a complex multilayered system. The regulation of this system is dependent not only on genetic but also on cellular environmental factors, such as hypoxia (26). In this study, we have performed analysis of the mRNA expression of the Fas and Rac1 genes and compared the results obtained in cells grown under normal and hypoxic conditions. We have revealed that hypoxia, i.e., the altered microenvironment, affects the Fas but not the Rac1 pre-mRNA splicing process. It is likely that the changes in the formation of mRNA isoforms of the Rac1 gene are due to tumor-specific genetic factors.

A number of authors also suggest that hypoxia is an integral part of the microenvironment of some tumors (26-28), thus it is not surprising that increased levels of soluble Fas have been detected in the blood serum of patients with various types of cancer. This is also reflected in the studies of this work: in various cell lines grown under hypoxia conditions, a decrease in the full-length Fas receptor expression was observed when compared to

cells grown under normal conditions. This hypoxia-regulated change in alternative pre-mRNA splicing, which increases the expression of the sFas mRNA isoform, explains how the process of alternative splicing helps the cancer cell to avoid apoptosis and survive.

It has been shown that splicing factors hnRNPA1 and SPF45 can individually regulate AS pre-mRNA exon 6 alternative splicing in a dose-dependent manner in normoxic cells (11,29-31). Our results indicate that hnRNP A1 and SPF45 protein expression levels vary in all the four tested cell lines. Additional studies showed that the small decrease in the expression of splicing factors SPF45 and hnRNP A1 found in HCT116 cells did not affect oxygen-dependent FAS pre-mRNA exon 6 alternative splicing. We did not find evidence that these factors, in a dose-dependent manner, are involved in hypoxia-dependent Fas pre-mRNA alternative splicing regulation. It cannot be excluded that additional, yet unidentified, splicing factor(s) are needed for hypoxia-dependent Fas alternative splicing regulation. Another possible explanation is that splicing factor modifications change under hypoxic environmental conditions, which alters the splicing factor's activity (2,32,33).

Various tumors are characterized by altered expression of splice factors and mRNA isoforms associated with oncological diseases (2,34-37). The evidence generated from the study of alternative splicing events and their role in different types of cancer promoted the development of various tools with therapeutic purposes. The literature describes various compounds which inhibit splicing or alter changes in mRNA expression for the treatment of cancer (38,39). However, experiments in mice and clinical trials of certain compounds delivered fairly contradicting results. For example, studies in the cell lines of compounds which inhibit N-methyltransferases for the treatment of oncological diseases showed that these compounds block the action of splicing factor-modifying proteins. They alter the function of the spliceosome and influence the processes of splicing which take place in the cells. However, clinical trials of N-methyltransferase inhibitors showed that the efficacy of these drugs is extremely limited, and they do not function the way they did in model cell line systems (40). Currently the growing body of evidence in the literature states that the cellular microenvironment influences other processes taking place in cells. The microenvironment influences DNA methylation, transcription, pre-mRNA splicing, as well as translation processes (41-45). It is therefore not surprising that compounds acting on the pre-mRNA splicing process manifested only very limited activity in tumors. To date, it is not entirely clear how the microenvironment affects the processes taking place in cells. The data obtained in this work is expected to

contribute to better understanding of the effect of the microenvironment on the processes taking place in the cell and to explain the regulatory functions of this effect. More detailed understanding of the regulation of processes in hypoxic cells will not only lead to the development of more effective drugs for the treatment of hypoxia-related diseases, but will also result in the development of innovative diagnostic methods.

CONCLUSIONS

1. Decreased expression of splicing factors SRSF1, SRSF2 and KHSRP was observed in pancreatic, colon and gastric tumors compared to healthy tissues. The expression of splicing factor U2AF65 in pancreatic and colon tumors decreased and in gastric tumors increased, while the expression of the splicing factor U2AF35 was decreased in colon and gastric tumors and increased in pancreatic tumors.
2. Increased expression of anti-apoptotic sFas mRNA isoforms was observed in the all examined tumors compared to healthy tissues, while increased expression of Rac1 mRNA isoform was detected in colon and gastric tumors.
3. The expression of splicing factors SRSF1, SRSF2, U2AF35, U2AF65 and KHSRP in all examined gastrointestinal tumors cell lines cultivated as monolayer, compared to the HEK 293A cell line, decreases.
4. The expression of Fas and Rac1 mRNA isoforms in examined gastrointestinal tumors cell lines cultivated as monolayer does not correspond to the expression profile of these mRNA isoforms detected in tumors tissues.
5. Hypoxic microenvironment alters the expression of Fas mRNA isoforms in cell lines derived from gastrointestinal tumors, but the expression of Rac1 mRNA isoforms is independent of hypoxia.
6. Expression of splicing factors SPF45 and hnRNP A1 does not depend on the hypoxic microenvironment in HCT116, HeLa, A549 and T3M4 cell lines.
7. Splicing factors SPF45 and hnRNP A1 do not regulate the formation of Fas gene mRNA isoforms under hypoxic environmental conditions in HCT116 cell line.

REFERENCES

1. Di, C., Syafrizayanti, Zhang, Q., Chen, Y., Wang, Y., Zhang, X., Liu, Y., Sun, C., Zhang, H., and Hoheisel, J. D. (2019) Function, clinical application, and strategies of Pre-mRNA splicing in cancer. *Cell death and differentiation* **26**, 1181-1194
2. Anczukow, O., and Krainer, A. R. (2016) Splicing-factor alterations in cancers. *Rna* **22**, 1285-1301
3. David, C. J., and Manley, J. L. (2010) Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes & development* **24**, 2343-2364
4. Izquierdo, J. M., Majos, N., Bonnal, S., Martinez, C., Castelo, R., Guigo, R., Bilbao, D., and Valcarcel, J. (2005) Regulation of Fas alternative splicing by antagonistic effects of TIA-1 and PTB on exon definition. *Molecular cell* **19**, 475-484
5. De, P., Aske, J. C., and Dey, N. (2019) RAC1 Takes the Lead in Solid Tumors. *Cells* **8**
6. Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**, 1759-1762
7. Owen-Schaub, L. B., Angelo, L. S., Radinsky, R., Ware, C. F., Gesner, T. G., and Bartos, D. P. (1995) Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Lett* **94**, 1-8
8. Cascino, I., Papoff, G., De Maria, R., Testi, R., and Ruberti, G. (1996) Fas/Apo-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* **156**, 13-17
9. Kong, J., Zhou, Z. J., Li, M., Zhou, W. H., Yuan, S. J., Yao, R. Y., Zhao, Y., and Wu, S. X. (2013) Wurtzite copper-zinc-tin sulfide as a superior counter electrode material for dye-sensitized solar cells. *Nanoscale research letters* **8**, 464
10. Jean-Philippe, J., Paz, S., and Caputi, M. (2013) hnRNP A1: the Swiss army knife of gene expression. *Int J Mol Sci* **14**, 18999-19024
11. Al-Ayoubi, A. M., Zheng, H., Liu, Y., Bai, T., and Eblen, S. T. (2012) Mitogen-activated protein kinase phosphorylation of splicing factor 45 (SPF45) regulates SPF45 alternative splicing site utilization, proliferation, and cell adhesion. *Mol Cell Biol* **32**, 2880-2893
12. Al-Ayoubi, A. M., Zheng, H., Liu, Y. Y., Bai, T., and Eblen, S. T. (2012) Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation of Splicing Factor 45 (SPF45) Regulates SPF45 Alternative Splicing Site Utilization, Proliferation, and Cell Adhesion. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 2880-2893
13. Liu, Y. Y., Conaway, L., Bethard, J. R., Al-Ayoubi, A. M., Bradley, A. T., Zheng, H., Weed, S. A., and Eblen, S. T. (2013) Phosphorylation of the alternative mRNA splicing factor 45 (SPF45) by Clk1 regulates its splice site utilization, cell migration and invasion. *Nucleic Acids Res* **41**, 4949-4962

14. Corsini, L., Bonnal, S., Basquin, J., Hothorn, M., Scheffzek, K., Valcarcel, J., and Sattler, M. (2007) U2AF-homology motif interactions are required for alternative splicing regulation by SPF45 (vol 14, pg 620, 2007). *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 785-785
15. Blencowe, B. J. (2017) The Relationship between Alternative Splicing and Proteomic Complexity. *Trends Biochem Sci* **42**, 407-408
16. Oltean, S., and Bates, D. O. (2014) Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene* **33**, 5311-5318
17. Kirschbaum-Slager, N., Lopes, G. M., Galante, P. A., Riggins, G. J., and de Souza, S. J. (2004) Splicing factors are differentially expressed in tumors. *Genetics and molecular research : GMR* **3**, 512-520
18. Koedoot, E., Smid, M., Foekens, J. A., Martens, J. W. M., Le Devedec, S. E., and van de Water, B. (2019) Co-regulated gene expression of splicing factors as drivers of cancer progression. *Scientific reports* **9**, 5484
19. Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M., and Krek, W. (2014) 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced drug delivery reviews* **69-70**, 29-41
20. Mirabelli, P., Coppola, L., and Salvatore, M. (2019) Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers* **11**
21. Singh, B., and Eyras, E. (2017) The role of alternative splicing in cancer. *Transcription* **8**, 91-98
22. Climente-Gonzalez, H., Porta-Pardo, E., Godzik, A., and Eyras, E. (2017) The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. *Cell reports* **20**, 2215-2226
23. Midis, G. P., Shen, Y., and Owen-Schaub, L. B. (1996) Elevated soluble Fas (sFas) levels in nonhematopoietic human malignancy. *Cancer research* **56**, 3870-3874
24. Baldwin, R. L., Tran, H., and Karlan, B. Y. (1999) Primary ovarian cancer cultures are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Gynecologic oncology* **74**, 265-271
25. Melzer, C., Hass, R., Lehnert, H., and Ungefroren, H. (2019) RAC1B: A Rho GTPase with Versatile Functions in Malignant Transformation and Tumor Progression. *Cells* **8**
26. Jing, X., Yang, F., Shao, C., Wei, K., Xie, M., Shen, H., and Shu, Y. (2019) Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular cancer* **18**, 157
27. Ratcliffe, P. J. (2013) Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *The Journal of physiology* **591**, 2027-2042
28. Semenza, G. L. (2010) HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* **20**, 51-56
29. Oh, H., Lee, E., Jang, H. N., Lee, J., Moon, H., Sheng, Z., Jun, Y., Loh, T. J., Cho, S., Zhou, J., Green, M. R., Zheng, X., and Shen, H. (2013) hnRNP A1 contacts exon 5 to promote exon 6 inclusion of apoptotic Fas

- gene. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **18**, 825-835
- 30.Liu, Y., Conaway, L., Rutherford Bethard, J., Al-Ayoubi, A. M., Thompson Bradley, A., Zheng, H., Weed, S. A., and Eblen, S. T. (2013) Phosphorylation of the alternative mRNA splicing factor 45 (SPF45) by Clk1 regulates its splice site utilization, cell migration and invasion. *Nucleic acids research* **41**, 4949-4962
- 31.Corsini, L., Bonnal, S., Basquin, J., Hothorn, M., Scheffzek, K., Valcarcel, J., and Sattler, M. (2007) U2AF-homology motif interactions are required for alternative splicing regulation by SPF45. *Nature structural & molecular biology* **14**, 620-629
- 32.Lenzken, S. C., Loffreda, A., and Barabino, S. M. (2013) RNA splicing: a new player in the DNA damage response. *International journal of cell biology* **2013**, 153634
- 33.Jakubauskiene, E., Vilys, L., Makino, Y., Poellinger, L., and Kanopka, A. (2015) Increased Serine-Arginine (SR) Protein Phosphorylation Changes Pre-mRNA Splicing in Hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **290**, 18079-18089
- 34.Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O., and Bradley, R. K. (2016) RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nature reviews. Cancer* **16**, 413-430
- 35.Kalnina, Z., Zayakin, P., Silina, K., and Line, A. (2005) Alterations of pre-mRNA splicing in cancer. *Genes, chromosomes & cancer* **42**, 342-357
- 36.Brinkman, B. M. (2004) Splice variants as cancer biomarkers. *Clinical biochemistry* **37**, 584-594
- 37.Venables, J. P., Klinck, R., Koh, C., Gervais-Bird, J., Bramard, A., Inkel, L., Durand, M., Couture, S., Froehlich, U., Lapointe, E., Lucier, J. F., Thibault, P., Rancourt, C., Tremblay, K., Prinos, P., Chabot, B., and Elela, S. A. (2009) Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nature structural & molecular biology* **16**, 670-676
- 38.Effenberger, K. A., Urabe, V. K., and Jurica, M. S. (2017) Modulating splicing with small molecular inhibitors of the spliceosome. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **8**
- 39.Corrionero, A., Minana, B., and Valcarcel, J. (2011) Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes & development* **25**, 445-459
- 40.Desterro, J., Bak-Gordon, P., and Carmo-Fonseca, M. (2020) Targeting mRNA processing as an anticancer strategy. *Nature reviews. Drug discovery* **19**, 112-129
- 41.Kim, M., and Costello, J. (2017) DNA methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Experimental & molecular medicine* **49**, e322
- 42.Zhang, M. W., Fujiwara, K., Che, X., Zheng, S., and Zheng, L. (2017) DNA methylation in the tumor microenvironment. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **18**, 365-372

43. Nakayama, K., and Kataoka, N. (2019) Regulation of Gene Expression under Hypoxic Conditions. *International journal of molecular sciences* **20**

44. De Palma, M., Biziato, D., and Petrova, T. V. (2017) Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **17**, 457-474

45. Brosseau, J. P., Lucier, J. F., Nwilati, H., Thibault, P., Garneau, D., Gendron, D., Durand, M., Couture, S., Lapointe, E., Prinos, P., Klinck, R., Perreault, J. P., Chabot, B., and Abou-Elela, S. (2014) Tumor microenvironment-associated modifications of alternative splicing. *Rna* **20**, 189-201

SANTRAUKA

Onkologinės ligos išlieka viena opiausių visuomenės problemų, nes sergamumas ir mirštamumas nuo jų nuolat didėja tiek Lietuvoje, tiek visame pasaulyje. Pastarojo dešimtmečio atradimai suteikė daug vertingos informacijos apie organizme vykstančius onkologinius procesus, tačiau akivaizdu, kad mūsų žinios šioje srityje vis dar nėra išsamios. Pre-iRNR splaisingas yra labai svarbus genų raišką reguliuojantis procesas, tad nieko keista, kad splaisingo pokyčiai nustatyti daugelio įvairių ligų, ypač onkologinių, atvejais. Taikomi naujaisi RNR tyrimų metodai leidžia nustatyti ne pavienius, o daugybinius ląstelėje vykstančius pre-iRNR splaisingo pasikeitimus. Remiantis šiais duomenimis, galima pabrėžti, kad pre-iRNR splaisingas yra ląstelėse vykstantis procesas, kuris ląstelėms padeda prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Pre-iRNR splaisingo pokyčiai tiesiogiai priklauso nuo šį procesą reguliuojančių splaisingo veiksnių. Tačiau su onkologinėmis ligomis siejamo pre-iRNR splaisingo pokyčių priežastys ir juos lemiantys veiksniai nėra iki galo išstudijuoti.

Šios **disertacijos tikslas** - sveikuose ir navikiniuose virškinimo trakto organų audiniuose bei iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose atlikti splaisingą reguliuojančių veiksnių ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos tyrimą ir nustatyti, ar (kaip) hipoksinė mikroaplinka ląstelėse veikia su onkologinėmis ligomis siejamus pre-iRNR splaisingo pokyčius.

Darbe nuodugniai ištirta su onkologinėmis ligomis siejamų Fas ir Rac1 genų pre-iRNR splaisingas ir šį procesą reguliuojančių veiksnių U2AF65, U2AF35, SRSF1, SRSF2 ir KHSRP raiška virškinimo trakto organų sveikuose ir navikiniuose audiniuose bei iš virškinimo trakto organų navikų išvestose ląstelių linijose. Šiame darbe nustatyti skirtingi splaisingo veiksnių baltymų ir su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR izoformų raiškos profiliai parodė, kad iš navikų išvestos ląstelių linijos skiriasi tiek nuo sveikų, tiek nuo navikinių audinių. Šie rezultatai leidžia patvirtinti, kad ląstelių linijos, kaip modelinė sistema, ne iki galo atspindi visus navikinėse ląstelėse vykstančius biologinius procesus. Moksliniame darbe atlikti hipoksinės mikroaplinkos poveikio pre-iRNR splaisingui tyrimai parodė, kad hipoksija skirtingose ląstelių linijose keičia Fas pre-iRNR alternatyvų splaisingą ir didina antiapotozinės sFas iRNR izoformos raišką. Tačiau Rac1 pre-iRNR splaisingas nuo hipoksijos nepriklauso. Tikėtinausia, kad Rac1 geno iRNR izoformų susidarymo pokyčius lemia navikui būdingi genetiniai veiksniai. Taip pat darbe parodyta, kad splaisingo veiksniai SPF45 ir hnRNP

A1 hipoksinėmis aplinkos sąlygomis Fas geno iRNR izoformų susidarymo neveikia.

Šie rezultatai suteikia naujų žinių apie tai, kokią įtaką ląstelių hipoksinė mikroaplinka daro su onkologinėmis ligomis siejamų iRNR raiškai. Pasinaudojant šiais duomenimis ir įvertinus hipoksinės mikroaplinkos poveikį, ląstelių modelinėse sistemose bus galima sukurti auglių mikroaplinką maksimaliai atitinkančias sąlygas. Tik tinkamai parinkta pradinių tyrimų modelinė sistema yra sėkmingų naujų antivėžinių terapijų pagrindas. Taip pat gauti rezultatai yra labai vertingi siekiant kontroliuoti su ligomis siejamų iRNR susidarymo procesus ir taip užkirsti kelią įvairiems patologiniams procesams.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. **Pečiulienė I**, Vilys L, Jakubauskienė E, Žaliauskienė L, Kanopka A, Hypoxia alters splicing of the cancer associated Fas gene. *Experimentas Cell Research*. 380 (2019) 29–35. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.04.015

2. Jakubauskienė E, **Pečiulienė I**, Vilys L, Mocevičius P, Vilkaitis G, Kanopka A, Gastrointestinal tract tumors and cell lines possess differential splicing factor expression and tumor associated mRNA isoform formation profiles. *Cancer Biomarkers*. 15 (2015) 575–581. DOI: 10.3233/CBM-150497

PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

Pečiulienė I, , Jakubauskienė E, Vilys L, Kanopka A, HIF-1 is indirectly involved in hypoxia dependent splicing regulation. Žodinis pranešimas 8-ojoje tarptautinėje konferencijoje „The Vital Nature Sign“ 2015, Kaunas, Lietuva.

Pečiulienė I, , Jakubauskienė E, Vilys L, Makimo M, Poelinger L, Kanopka A, Hypoxia dependent splicing regulation. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „VitaScientia“ 2016, Vilnius, Lietuva.

Pečiulienė I, Vilys L, Jakubauskienė E, Gulbinas A, Kanopka A, Cell lines possess differential splicing factors expression and tumor associated mRNA isoform formation profiles. Kviestinis pranešėjas 9-ojoje tarptautinėje konferencijoje „The Vital Nature Sign“ 2017, Kaunas, Lietuva.

Pečiulienė I, Jakubauskienė E, Vilys L, Kanopka A, cell lines possess differential splicing factors expression and tumor associated mRNA isoform formation profiles. Stendinis pranešimas tarptautinėje konferencijoje „VitaScientia“ 2018, Vilnius, Lietuva.

Pečiulienė I, Jakubauskienė E, Vilys L, Janulevičiūtė G, Kanopka A Cellular hypoxia and Fas pre-mRNA alternative splicing. Stendinis pranešimas (The 24th Annual Meeting of the RNA Society, Krokua, Lenkija 2019)

CURRICULUM VITAE

Vardas, pavardė	INGA PEČIULIENĖ (VAINIKONYTĖ)
Gimimo data, vieta	1980-12-22, Kaunas, Lietuva
Darbo adresas	Vilniaus universitetas (VU), Gyvybės mokslo centras (GMC), Biotechnologijos institutas (BTI), Imunologijos ir lątelės biologijos skyrius (ILBS)
Telefonas, el paštas	8 (5) 2234369inga.peciuliene@bti.vu.lt
Išsilavinimas	
1999-2003	Kauno technologijos universitetas, Chemijos technologijos ir inžinerijos studijų programa (61205T102); Chemijos inžinerijos bakalauro laipsnis
2003-2005	Kauno technologijos universitetas, Biotechnologijos studijų programa (61205T101), Chemijos inžinerijos magistro laipsnis
2005-2011	Chemijos inžinerijos doktorantūros studijos BTI ILBS
Darbo patirtis	
2008-2011	BTI Imunologijos ir lątelės biologijos laboratorijos bioinžinierė
2011-2015	VU (GMC) BTI ILBS biologė tyrėja
2016-2019	Lietuvos sveikatos mokslų universiteto ligoninės Kauno Klinikų (LSMU KK) Imunologijos ir alergologijos klinikos laboratorijos (IMAKL) biologė
Nuo 2015	VU GMC BTI ILBS jaunesnioji mokslo darbuotoja
Nuo 2019	LSMU KK IMAKL kokybės vadybininkė
Stažuotės, praktikos	
2006 07-08	Karolinkos Institutas, Stokholmas, Švedija, praktika pagal ES „Biocell“ programą
2006-2008	Karolinkos Institutas, Stokholmas, Švedija, stažuotė gavus Swedish Institute „Visby“ programos stipendiją
2006 12	Mastrichtas, Olandija, ES finansuojamos 6-osios BP „Euroxy“ programos organizuoti kursai doktorantams

2008 03-07	Stažuotė Karolinos Institute, Ląstelės biologijos laboratorijoje, Stokholmas, Švedija
2008 07-08	Stažuotė Karolinos St. Erik ligoninės Molekulinės ir ląstelės biologijos tyrimų skyriuje, Stokholmas, Švedija
Projektinė veikla	
2004-2009	ES 6-osios bendrosios programos projekto "Naujai atrasti deguonies sensoriai, kaip nauji priešvėžinių vaistų taikiniai" („Targeting newly discovered oxygen-sensing cascades for novel cancer treatments“), vykdytoja
2009-2014	ES 7-osios bendrosios programos projektas „Hipoksinės aplinkos įtaka metastatinių vėžinių auglių vystimuisi" ("Metastatic tumours facilitated by hypoxic tumour micro-environments“), vykdytoja.
2012-2014	Nacionalinės mokslo programos „Lėtinės neinfekcinės ligos“ projekto „Splaisingo faktoriai ir jų reguliuojamos miRNR kaip virškinimo sistemos vėžinių susirgimų biožymenys“, vykdytoja.
Nuo 2019 04	Projekto „Vienos molekulės TOP-seq - inovatyvi technologinė platforma ankstyvai neinvazinei vėžio ir kitų epigenetinių susirgimų diagnostikai“, darbuotoja
Nuo 2020 03	Nacionalinės mokslo programos „Sveikas senėjimas“ projekto „Hipoksija kaip ląstelių stresas, sukiantis mRNR įvairovę ir senėjimą“, vykdytoja.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo disertacijos vadovui dr. Arvydui Kanopkai už visokeriopą pagalbą ir palaikymą atliekant šį darbą. Ačiū už Jūsų įžvalgas ir patarimus, nuolatinį skatinimą tobulėti, mokslines diskusijas ir pamokymus. Ačiū už tikėjimą manimi tuomet, kai net pati savimi abejojau. Ačiū už rūpestį, globą ir supratimą. Darbas su Jumis yra geriausia, kas kada nors man galėjo nutikti.

Iš visos širdies dėkoju „hipoksijos kambario“ kolektyvui. Egle, ačiū tau už kantrybę, už tai, kad niekada neatsisakai manęs išklaudyti. Ačiū už visus patarimus, pastebėjimus ir diskusijas. Be jų savo darbo dienos tiesiog neįsivaizduoju. Laurynai, ačiū už tai, kad nepailstamai stengiesi įvesti tvarką laboratorijoje, nors tam prieštarauja visos joje siaučiančios jėgos. Ačiū tau už pagalbą rengiant šią disertaciją ir už pašnekesius apie gyvenimą ir mokslą.

Dėkoju visiems VU GMC Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriaus vedėjai prof. dr. Aurelijai Žvirblienei ir visiems esamiems ir buvusiems šio skyriaus darbuotojams. Ačiū už naudingas diskusijas ir visuomet gerą, draugišką atmosferą.

Esu labai dėkinga dr. Arūnui Kazlauskui už pagalbą man žengiant pirmuosius savo žingsnius laboratorijoje.

Ačiū dr. Daumantui Matuliui už pagalbą kai studijų metu keitėsi mano darbo vadovai.

I am sincerely grateful to dr. Lorenz Poellinger. Rest in peace dear professor. The opportunity to work in the Department of Cell Biology at the Karolinska University under your supervision for two years has been a pleasure and valuable learning experience for me. You was brilliant scientist and you shared you knowledge with all of those you worked with.

My friends, who made Sweden a second home to me. Helder, meeting you was so unexpected and surprising. You showed me the world full of different tasted, smells and colors. You always thought me to think “outside the box“...Thank you for all talks, laughs and adventures. Thank you for being my friend. Cecilia, you joy of life always was an inspiration for me...I cherish all times we spent together talking about science and life while drinking the morning coffee. Jose thank you for all scientific conversations and all good times we had. Katerina, thank you for taking care of me and helping to solve my problems and always having a time for me.

Ačiū vyrui ir vaikams už jų kantrybę ir supratingumą, už visus tuos kartus, kai darbas buvo svarbesnis... Tik Jūsų dėka galėjau pasiekti tai, ką turiu. Ačiū broliui už tai, kad nuo tada, kol save pamenu, iki šiol yra ištikimiausias mano sąjungininkas.

Ypatingas Ačiū mano tėveliams, kurie visada buvo ir yra mano gyvenimo atspirties taškas. Jūs suteikėt mano svajonėms sparnus. Mamuliuk, ačiū, kad nesiliauji manęs globoti ir saugoti. Žinau, jei ir vėl pavėluosiu į traukinį, tu visais už mane pasirūpinsi....

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 16 egz