VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Daniel Naumovas

VĖŽINIŲ LĄSTELIŲ REAKCIJOS Į POVEIKĮ JONIZUOJANČIĄJA SPINDULIUOTE ĮVERTINIMAS: FUNKCINĖ IR GENŲ SĄVEIKOS TINKLŲ ANALIZĖ

EVALUATION OF CANCER CELL RESPONSE TO THE TREATMENT OF IONIZING RADIATION: FUNCTIONAL AND GENE CO-EXPRESSION NETWORK ANALYSIS

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003
Biotechnologijų studijų kryptis

Vilnius, 2018

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

_____
(Parašas)
Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)
_____
(Data)

Daniel Naumovas

VĖŽINIŲ LĄSTELIŲ REAKCIJOS Į POVEIKĮ JONIZUOJANČIĄJA SPINDULIUOTE ĮVERTINIMAS: FUNKCINĖ IR GENŲ SĄVEIKOS TINKLŲ ANALIZĖ

EVALUATION OF CANCER CELL RESPONSE TO THE TREATMENT OF IONIZING RADIATION: FUNCTIONAL AND GENE CO-EXPRESSION NETWORK ANALYSIS

Baigiamasis magistro darbas

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003
Biotechnologijų studijų kryptis

Vadovas dr. Eglė Strainienė _____ _____
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Lietuvių kalbos konsultantas lekt. Regina Žukienė _____ _____
(Moksl. laipsnis/pedag. vardas, vardas, pavardė) (Parašas) (Data)

Vilnius, 2018

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Biotechnologijų studijų kryptis

Nanobiotechnologijos studijų programa, valstybinis kodas 621J70003

TVIRTINU
Katedros vedėjas

_____
(Parašas)
Jaunius Urbonavičius
(Vardas, pavardė)

_____
(Data)

BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO

UŽDUOTIS

…….....Nr. .....

Vilnius

Studentui Danieliui Naumovui

Baigiamojo darbo tema: **Vėžinių ląstelių reakcijos į poveikį jonizuojančiąja spinduliuote įvertinimas: funkcinė ir genų sąveikos tinklų analizė.**

Patvirtinta 2017 m. spalio 26 d. dekano potvarkiu Nr. 444fm.

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 2018 m. gegužės 25 d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTYS:

1. Įvertinti jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį genų koekspresijai žmogaus kolorektalinio vėžio ląstelėse;
2. Nustatyti esminius signalinius kelius bei genus pakitusius po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote žmogaus kolorektalinio vėžio DLD1 bei iVKL-DLD1 ląstelėse;
3. Įvertinti PARP šeimos genų išveiklinimo įtaką DLD1 ir HT29 ląstelių išgyvenamumui po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote vienkartine ir frakcionuota dozėmis.

Vadovas _____ dr. Eglė Strainienė
(Parašas) (Moksl. laipsnis/pedag. vardas, pavardė)

Užduotį gavau

_____
(Parašas)
Daniel Naumovas
(Vardas, pavardė)

_____
(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk. ……..
Data ….-….-….

Antrosios pakopos studijų **Nanobiotechnologijos** programos magistro baigiamasis darbas
Pavadinimas **Vėžinių ląstelių reakcijos į poveikį jonizuojančiąja spinduliuote įvertinimas: funkcinė ir genų saveikos tinklų analizė**
Autorius **Daniel Naumovas**
Vadovas **dr. Eglė Strainienė**

Kalba: lietuviu

Anotacija

Baigiamojo magistro darbo metu tirtas kolorektalinio vėžio ląstelių atsakas į poveikį jonizuojančiąja spinduliuote (JS) vienkartinėmis bei frakcionuotomis dozėmis. Pasinaudojant svertine genų koekspresijos tinklo analize ištirti 31-os mikrogardelės duomenys ir nustatyta, kad po poveikio JS kolorektalinėse vėžinėse ląstelėse patikimai koekspresuojami ląstelės ciklo, imuninio atsako ir DNR pažaidų taisymo ontologinių procesų genai.

Taip pat šiame darbe lyginti visuminiai genų raiškos pokyčiai po poveikio JS tarp laukinio tipo DLD ir vėžinių kamieninių DLD1 (iVKL-DLD1) ląstelių. Bioinformatinė analizė atskleidė, kad DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelių atsako į poveikį frakcionuota JS doze metu aktyvinami tie patys signaliniai keliai: ląstelės ciklo bei DNR pažaidų taisymo, tačiau skiriasi juose dalyvaujantys genai.

Tiriant skirtingose modelinėse sistemose augintas DLD1 ir HT29 ląsteles, turinčias išveiklintus PARP12, PARP13 ar PARP14 genus, pastebėta, kad ląstelės, turinčios išveiklintą PARP13 ar PARP14 geną, yra jautresnės spinduliuotės poveikiui ir galėtų būti potencialiais priešvėžinės terapijos taikiniais.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis: 68 puslapių teksto (su priedais), 13 paveikslų, 8 lentelės, 160 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: jonizuojančioji spinduliuotė, 3D ląstelių kultūros, vėžinės kamieninės ląstelės, VKL, genų raiškos analizė, genų saveikos tinklų analizė, PARP12, PARP13, PARP14.

Vilnius Gediminas Technical University
Faculty of Fundamental Sciences
Department of Chemistry and Bioengineering

ISBN ISSN
Copies. No. ……..
Date ….-….-….

Master Degree Studies **Nanobiotechnology** study programme Master Graduation Thesis

Title **Evaluation of Cancer Cell Response to The Treatment of Ionising Radiation: Functional and Gene Co-Expression Network Analysis**

Author **Daniel Naumovas**

Academic supervisor **dr. Eglė Strainienė**

Thesis langueage: Lithuanian

Annotation

The aim of this study was to analyse the response of colorectal cancer cells to ionizing radiation (IR) by single and fractionated doses. 31 microarray data were studied using weighted gene co-expression network analysis. It was determined that after exposure to IR, genes responsible for cell cycle, immune response and DNA damage repair, were significantly co-expressed in human colorectal cancer cells.

Also, in this study, we compared wild type DLD1 and cancer stem DLD1 cells (iCSC-DLD1) whole-genome expression profiles after exposure to IR. Bioinformatical analysis revealed, that DLD1 and iCSC-DLD1 cell response to fractionated dose of IR is quite similar – the same signaling pathways are activated, but different genes are involved.

While studying human colon carcinoma DLD1 and HT29 PARP9/12/13/14 knockout cell lines grown in different cell culture systems, it was determined that the PARP13 and PARP14 knockout HT29 and DLD1 cells are more radiosensitive than wild type cells, therefore, these genes could be used as potential anticancer targets

Structure: introduction, literature overview, materials and methods, results, conclusions and references.

Thesis consists of: 68 pages of text (with supplement), 13 pictures, 8 tables, 160 references.

Keywords: ionising radiation, 3D cell culture, cancer stem cells, CSC, gene expression analysis, gene co-expression network analysis, PARP12, PARP13, PARP14.

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo organizavimo tvarkos aprašo
2 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Daniel Naumovas, 20123830

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Nanobiotechnologija, NBTfm-16

(Studijų programa, akademinė grupė)

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA

2018 m. gegužės 24 d.

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas tema „Vėžinių ląstelių reakcijos į poveikį jonizuojančiąja spinduliuote įvertinimas: funkcinė ir genų sąveikos tinklų analizė“ patvirtintas 2017 m. spalio 26 d. dekano potvarkiu Nr. 444fm, yra savarankiškai parašytas. Šiame darbe pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Parenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą, mane konsultavo dr. Eglė Strainienė.

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą nėra. Jokių įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

(Parašas) (Vardas ir pavardė)

TURINYS

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS....9
SANTRUMPŲ SĄRAŠAS....10
ĮVADAS....11
1. LITERATŪROS APŽVALGA....13
1.1. Jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis ląstelėms....13
1.1.1. Ląstelių atsakas į DNR pažaidas....13
1.1.2. Ląstelės ciklo reguliavimas....14
1.1.3. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukelta apoptozė....15
1.1.4. Viengrandinių ir dvigrandinių DNR pažaidų taisymas....17
1.1.5. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukelta autofagija....20
1.1.6. Streso sukeltas ląstelių senėjimas....21
1.2. PARP genų svarba vėžinių ląstelių atsake į JS poveikį....21
1.2.1. PARP genų reguliuojamas DNR pažaidų taisymas....22
1.2.2. PARP slopinimas ir vėžio gydymas....24
1.3. Vėžio kamieninės ląstelės....25
1.3.1. Kolorektalinio vėžio KL biožymenys....25
1.3.2. Vėžinių kamieninių ląstelių sąsajos su atsparumo JS poveikiui įgavimu....28
2. MEDŽIAGOS IR METODAI....31
2.1. Medžiagos....31
2.1.1. Reagentai ir tirpalai....31
2.1.2. Rinkiniai....31
2.1.3. Laboratorinė įranga....31
2.1.4. Kitos priemonės....32
2.1.5. Mitybinės terpės....32
2.1.6. Ląstelių kultūros....32
2.1.7. TL-PGR naudojami pradmenys....33
2.2. Tyrimo metodai....33
2.2.1. Ląstelių kultivavimas....33
2.2.1.1. Ląstelių auginimas 2D sąlygomis....33
2.2.1.2. Ląstelių auginimas 3D sąlygomis – sferoidų formavimas....34
2.2.1.3. Sferoidų dydžių įvertinimas....35

2.2.1.4. Ląstelių auginimas 3D sąlygomis – auginimas tarpląsteliniame užpilde „GeltrexTM“ 36
2.2.2. Ląstelių švitinimas jonizuojančiąja spinduliuote 36
2.2.3. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas 36
2.2.3.1. Klonogeninė analizė 36
2.2.3.2. Ląstelių auginamų 3D struktūroje išgyvenamumo įvertinimas 37
2.2.4. Genų raiškos pokyčių įvertinimas 38
2.2.4.1. RNR skyrimas 38
2.2.4.2. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė 38
2.2.4.3. Tikro laiko polimerazinė grandininė reakcija 39
2.2.5. Statistinė ir bioinformatinė duomenų analizė 40
2.2.5.1. Svertinė genų koekspresijos tinklo analizė 40
2.2.5.2. Duomenų statistinė analizė 41
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 42
3.1. Genų koekspresijos analizė po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote žarnyno vėžinėse ląstelėse 42
3.2. Visuminės genų raiškos analizė jonizuojančiąja spinduliuote paveiktose DLD1 ir iVKL DLD1 ląstelėse augintose 3D modelinėje sistemoje 47
3.3. PARP šeimos genų įtaką lątelių išgyvenamumui po poveikio JS 53
IŠVADOS 59
LITERATŪROS SĄRAŠAS 60
PRIEDAI 67

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

1 pav. Ląstelių atsako į JS poveikį schema. 14
2 pav. Dvigrandinių trūkių taisymo schema....19
3 pav. Žmogaus PARP baltymų domeninė organizacija ir katalitinis aktyvumas....23
4 pav. Hemocitometrinės 3x3 kameros padidintas vaizdas. 35
5 pav. Koekspresuojamų genų moduliai ir jų genų ontologinio (GO) praturtinimo analizė....43
6 pav. Ląstelės ciklo, imuninio atsako ir DNR pažaidų modulių genų sąveikos tinklai. 45
7 pav. Veno diagrama vaizduojanti skirtingai reguliuojamųjų genų pasiskirstymą frakcionuota JS doze veiktose laukinio tipo DLD1 ir iVKL DLD1 ląstelėse. 48
8 pav. Ugnikalnio grafikas vaizduojantis genų raiškos pokyčius po poveikio JS DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse 52
9 pav. Mikrogardelių tyrimo duomenų validacija TL-PGR metodo pagalba....52
10 pav. Ląstelių morfologija auginant skirtingose modelinėse sistemose....53
11 pav. PARP genų išveiklinimo įtaka ląstelių gyvybingumui po poveikio JS 2D ir 3D-GT modelinėse sistemose. 54
12 pav. DLD1 sferoidų morfologija bei vidutinis skersmuo 14 dienų laikotarpiu....56
13 pav. HT29 sferoidų morfologija bei skersmuo 14 dienų laikotarpiu....57

1 lentelė Skirtinguose vėžio tipuose randamų VKL žymenys....26
2 lentelė. TL-PGR naudojami pradmenys 33
3 lentelė. Sferoidų formavimui naudojamų ląstelių skaičius....35
4 lentelė. Klonogeninei analizei naudojamas ląstelių kiekis 37
5 lentelė. Pirmosios grandinės kDNR sintezės mišinys vienai reakcijai 39
6 lentelė. TL-PGR mišinys vienai reakcijai....39
7 lentelė. TL-PGR reakcijos programa....40
8 lentelė. Skirtingai reguliuojamų genų skaičius DLD1 ir iVKL DLD1 ląstelėse. 48
9 lentelė. Signaliniai keliai, bei juose dalyvaujantys genai, praturtinti DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse po poveikio frakcionuota JS....50

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

1x2 Gy – vienkartinė 2 grėjų dozė;

1x6 Gy – vienkartinė 6 grėjų dozė;

3D-M – 3D modelinė sistema, kur ląstelės auginamos tarpląstelinio užpildo baltymuose;

3D-SF – 3D sferoidų modelinė sistema;

5x2 Gy – frakcionuota 2 grėjų dozė;

BER – bazių iškirpimo reparacija (angl. *base excision repair*);

CAFs – su vėžiu susiję fibroblastai (angl. *cancer-associated fibroblasts*);

DNR-PK – DNR baltymų kinazė;

DSB – dvigrandiniai DNR trūkiai (angl. *double strand break*);

FDA – JAV maisto ir vaistų administracija (angl. *food and drug administration*);

GEO – mikrogardelių ir RNR sekoskaitos duombazė (angl. *Gene Expression Omnibus*);

HR – homologinės rekombinacijos (angl. *homologous recombinations*);

HUB – daugiausia saveikų turintys genais (angl. *highly connected genes*);

iVKL – indukuotos vėžinės kamieninės ląstelės;

JS – jonizuojančioji spinduliuotė;

KL – kamieninės ląstelės;

NER – nukleotidų iškirpimo reparacija (angl. *nucleotide excision repair*);

NHEJ – nehomologinių galų sujungimas (angl. *non-homologous end joining*);

ROS – aktyvios deguonies formos (angl. *reactive oxygen species*);

SSB – viengrandiniai DNR trūkiai (angl. *single strand break*);

TL-PGR – tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (angl. *Real-time polymerase chain reaction*);

ŪML – ūminė mieloidinė leukemija;

VKL – vėžinės kamieninės ląstelės;

WGCNA –svertinė genų koekspresijos tinklo analizė (angl. *Weighted gene co-expression network analysis*).

ĮVADAS

Kolorektalinis vėžys yra vienas iš dažniausiai diagnozuojamų vėžio formų pasaulyje. Iki šių dienų radioterapija viena arba kartu su chirurgija ir chemoterapija yra neatsiejama priešvėžinio gydymo dalis. Nepaisant naujų spindulinės terapijos įrangos ir metodų gerinimo, vis dar didžiulis skaičius pacientų nepasiekia norimo gydymo rezultato dėl ligos atsinaujinimo. Remiantis skirtingais *in vitro* ir *in vivo* tyrimais nustatyta, kad vėžio atsinaujinimas yra susijęs su radioatsparumu (Krause *et al*. 2017; Seshacharyulu *et al*. 2017). Dėl šios priežasties, yra siekiama nustatyti molekulinius mechanizmus mažinančius spindulinės terapijos efektyvumą bei padidinti pacientų išgyvenamumą. Tokių molekulinių mechanizmų nustatymui, plačiai naudojami visuminės genų raiškos analizės metodai.

Šiai analizei naudojami du pagridiniai metodai – mikrogardelių ir RNR sekoskaita. GEO (angl. *Gene Expression Omnibus*) ir kitose duomenų bazėse sukaupti genų raiškos duomenys apie kolorektalinio vėžio ląstelių atsaką į JS leidžia iš naujo įvertinti šiuos molekulinius mechanizmus. Tokia informacija suteikia papildomą statistinę naudą, nes mėginių skaičius išauga keliasdešimt kartų. Pasinaudojant svertine genų koekspresijos tinklo analize (angl. *Weighted gene co-expression network analysis, WGCNA*), sukuriamas bemąstelinis (angl. *scale-free*) genų koekspresijos tinklas (Langfelder ir Horvath 2008). Tokiu būdu analizuojant genų raiškos duomenis gautus paveikus vėžines ląsteles jonizuojančiąja spinduliuote (JS), galima gauti daug vertingos informacijos apie vėžinių ląstelių atsaką į JS bei atsparumo radiacijai vystymąsi.

Nustatyta, kad vėžinių ląstelių atsparumas JS priklauso nuo DNR pažaidų taisymo greičio, todėl yra svarbu tirti su DNR pažaidomis susijusius signalinius kelius bei juose dalyvaujančius genus. Vieni tokių genų priklauso Poli-ADP-ribozės polimerazės (PARP) šeimai. Nors PARP1, PARP2 ir PARP3 sąsajos su naviku ir DNR pažaidų taisymu yra žinomos, apie kitus PARP baltymus informacijos yra nedaug, o jie gali būti potencialiais priešvėžinių terapijų taikiniais (Morales *et al*. 2014).

Manoma, kad pagrindinė priežastis, dėl kurios vėžinės ląstelės įgauna atsparumą radioterapijai bei kitoms priešvėžinėms terapijoms, yra maža vėžinių ląstelių populiacija vadinama vėžinėmis kamieninėmis ląstelėmis (VKL) (Jiang *et al*. 2016). Šios ląstelės atlieka savęs atnaujinimo ir ląstelės ciklo reguliavimo funkciją, pasižymi aukštu diferenciacijos potencialu, greitu DNR pažaidų taisymo mechanizmu, pagreitintu autofagijos procesu bei greičiau nei įprastos vėžinės ląstelės šalina aktyvias deguonies formas (angl. *reactive oxygen species, ROS*) (Liou ir Storz 2010). Suradus su VKL susijusius signalinius kelius bei genus atsakingus už atsparumo radioterapijai formavimą, būtų galima ląsteles įjautrinti ir gydymas taptų efektyvesnis.

Tikslas – įvertinti žmogaus kolorektalinio vėžio ląstelių reakciją į poveikį jonizuojančiąja spinduliuote (JS).

Tikslui pasiekti iškelti šie **uždaviniai:**

1) Įvertinti jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį genų koekspresijai žmogaus kolorektalinio vėžio ląstelėse;
2) Nustatyti esminius signalinius kelius bei genus pakitusius po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote žmogaus kolorektalinio vėžio DLD1 bei iVKL-DLD1 ląstelėse;
3) Įvertinti PARP šeimos genų išveiklinimo įtaką DLD1 ir HT29 ląstelių išgyvenamumui po poveikio jonizuojančiąja spinduliuote vienkartine ir frakcionuota dozėmis.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

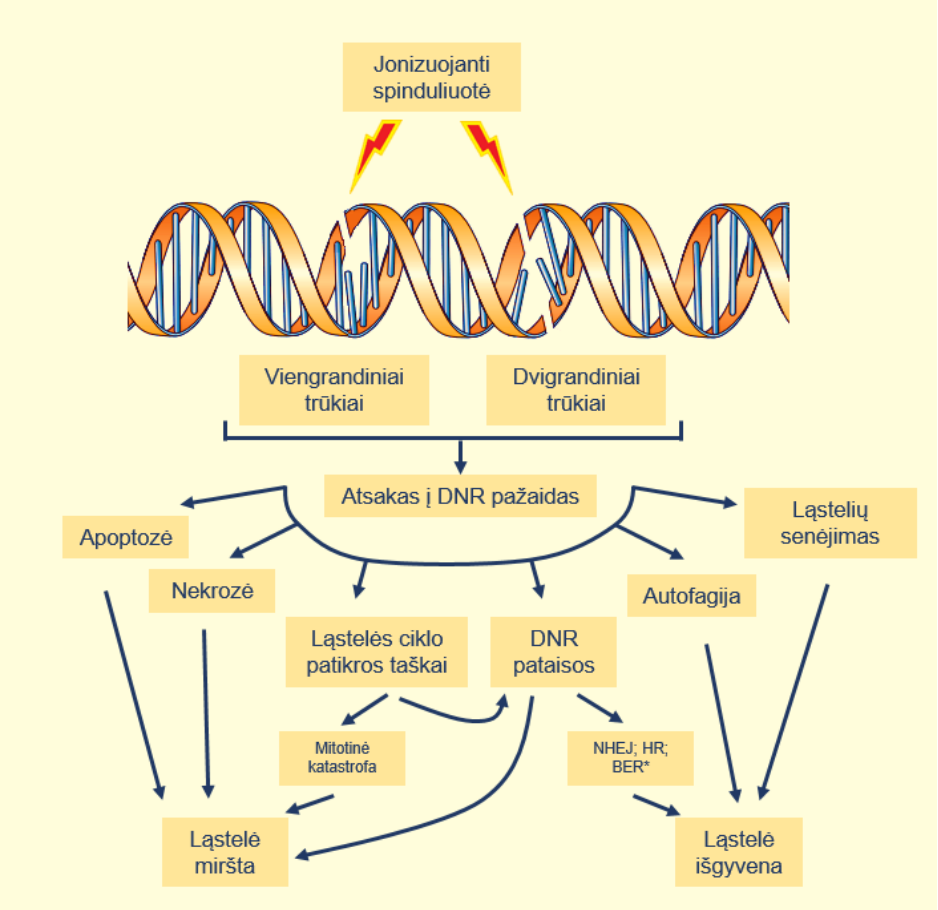
1.1. Jonizuojančiosios spinduliuotės poveikis ląstelėms

Radioterapijos istorija prasideda vėlyvajame 19-ame amžiuje, kai Vilhelmas Konradas Rentgenas atrado jonizuojančiuosius spindulius (JS), kurie vėliau pavadinti mokslininko garbei. Iki šių dienų radioterapija, viena arba kartu su chirurgija ir chemoterapija, yra neatsiejama priešvėžinio gydymo dalis. Apšvitinus audinį aukštos energijos jonizuojančiąja spinduliuote (dažniausiai – rentgeno ar gama spinduliais, rečiau – protonų, elektronų, neutronų, srautais) įvyksta DNR pažaidos ir sutrikdomi greitai besidauginančių ląstelių dalijimosi procesai (Thariat *et al*. 2013; Evans ir Staffurth 2018). Kadangi piktybinių navykinių ląstelių dvigubėjimo laikas yra daug trumpesnis negu sveikų ląstelių, jos yra labiau jautrios jonizuojančiosios spinduliuotės poveikiui. Be to, daugelio mokslininkų atlikti tyrimai rodo, kad po poveikio genotoksiniais agentais vėžinėse ląstelėse įvyksta daugiau DNR pažaidų ir jų taisymas užtrunka ilgiau nei sveikose ląstelėse (Shahidi *et al*. 2010; Baskar *et al*. 2012).

1.1.1. Ląstelių atsakas į DNR pažaidas

Po poveikio JS ląstelėse aukštos energijos fotonai sąveikauja su elektronais, o dėl to elektronas įgauna dalį fotonų energijos. Tokie elektronai tiesiogiai sukelia DNR pažaidas jonizuojant DNR spiralėje esančius atomus arba netiesiogiai – jonizuojant aplinkines molekules turinčias deguonies atomus (pvz. vandenį). Kadangi apie 70 % ląstelės tūrio sudaro vanduo dėl netiesioginio poveikio susidaro reaktyvūs laisvieji radikalai, kurie sąveikauja su DNR molekulėmis, taip sukeldami trūkius DNR grandinėje (Despuky *et* al. 2015; Sashacharyulu *et al*. 2017).

Veikiant tiesioginiam arba netiesioginiam DNR pažaidų mechanizmams susidaro viengrandiniai (angl. *single strand break* (SSB)) ir/arba dvigrandiniai DNR trūkiai (angl. *double strand break* (DSB)). Pirmi prie JS sukeltų DNR pažaidų atvyksta PIKK (angl. *phosphoinositide 3-kinase-like kinase*) kinazių šeimos atstovai: ATM (angl. *antaxia-telangiectasia mutated*) ir ATR (angl. *ATM and Rad3 related proteins*) baltymai (Alexander ir Walker 2010). Jie fosforilina ląstelės ciklą reguliuojančius baltymus (p53 (angl. *tumor protein p53*); CHK2 (angl. *checkpoint kinase 2*); BRCA1 (angl. *breast cancer 1*) ir NBN (angl. *nibirin*)) bei yra tiesiogiai susiję su signaliniais keliais kontroliuojančiais ląstelės ciklą ir senėjimą, apoptozės procesus, DNR pataisų mechanizmus bei autofagiją (1 pav.) (Ahmed ir Li 2007; Sashacharyulu *et al*. 2017).



1 pav. Ląstelių atsako į jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį schema. JS tiesiogiai arba netiesiogiai padaro viengrandinius ir/arba dvigrandinius DNR trūkius. Tokios DNR pažaidos aktyvina apoptozės, nekrozės, ląstelės ciklo reguliavimo, DNR pataisų ar autofagijos signalinius kelius, kurių rezultatas yra ląstelės žūtis arba tolimesnis augimas. Paveikslas sukurtas remiantis Baskar *et al*. 2014; Wang 2015 ir Seshacharyulu *et al*. 2017 pateiktais duomenimis. *NHEJ (angl. *non-homologous end joining*); HR (angl. *homologous recombinations*); BER (angl. *base excision repair*).

1.1.2. Ląstelės ciklo reguliavimas

Ląstelės ciklą reguliuojantys baltymai pirmieji dalyvauja formuojant atsaką į jonizuojančiosios spinduliuotės poveikį. Jeigu apšvitinimo JS metu ląstelė yra mitozės fazėje, dėl susidarančių dvigrandžių trūkių įvyksta ląstelės mitotinė katastrofa ir mirtis. Dėl to pirmiausia yra užblokuojamas ląstelės ciklas, t.y. aktyvuojami G1/S ir G2/M patikros taškai (Reinhardt ir Schumacher 2012).

Esant viengradiniam DNR trūkiui aktyvuojama ATR kinazė, o esant dvigrandiniam DNR trūkiui – ATM. ATR fosforilinant aktyvuoja patikros taškų kinazę CHK1 (angl. *checkpoint kinase 1*), o ATM – CHK2. Šios kinazės fosforilina tris CDC25 (angl. *cell division cycle 25*) baltymo izoformas, taip inicijuojant jo ubikvitilinimą ir taip nukreipiant tolimesniu degradacijos keliu. Kai ląstelėje yra mažai CDC25, tada CDK1 ir CDK2 (angl. *cyclin dependant kinase 1 and*

2) nėra aktyvuojami ir ląstelės ciklas sustabdomas atitinkamai G1 arba G2 fazėje. ATM kinazė taip pat fosforilina ir vėžio supresorinį p53 baltymą, kuris yra ciklinų slopikliaus p21 transkipcijos faktorius. P21 slopinant CDK4 ir CDK6 aktyvumą ir sustabdo ląstelės ciklą G1 fazėje. Esant stipriai padidėjusiai p21 baltymo raiškai jis prisijungia prie CDK1-ciklino B komplekso ir neleidžia ląstelėms dvigubėti, t.y. sustabdo ląstelės ciklo perėjimą iš G2 į mitozės fazę (Pflaum *et al*. 2014; Zhang *et al*. 2016).

ATM ir ATR kinazių svarbą ląstelių atsake į JS poveikį geriausiai parodo tyrimai su ląstelėmis turinčiomis nuslopintus, mutavusius arba išjungtus ATM ar ATR genus (Fokas *et al*. 2012; Muraki *et al*. 2013). Tokios ląstelės yra ypač jautrios (angl. *hypersensitive*) radiacijos poveikiui bei pasižymi ląstelės ciklo pokyčiais. Įvykus jonizuojančiosios spinduliuotės sukeltoms DNR pažaidoms, ląstelės ciklas nėra sustabdomas, DNR pažaidos nebepataisomos ir įvyksta ląstelių mitotinė katastrofa. Manoma, kad mitotinė katastrofa yra pagrindinė radiacijos poveikio sukelta ląstelės mirties forma. Ji įvyksta kai nepasibaigus S ir G2 ciklo fazėms prasideda mitozės fazė. Sutrikusios mitozės metu įvyksta nenormali chromosomų segregacija ir neįprastas ląstelių dalijimasis, t.y. tokios ląstelės negali iki galo pasidalinti, jos tampa gigantiško dydžio bei jose atsiranda keletas neaiškios morfologijos branduolių (Riesterer *et al*. 2011, Vitale *et al*. 2011). Mitotinę katastrofą patyrusios ląstelės dažniausiai iš karto žuva metafazės arba interfazės metu. Kartais metafazės metu taip pat yra įjungiami apoptotiniai signaliniai keliai, kurių rezultatas – pavėluota apoptozė kuri gali pasireikšti iki 6 dienų po švitinimo JS (Alexander ir Walker 2010).

1.1.3. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukelta apoptozė

Radiacijos poveikis ląstelėse dažniausiai aktyvuoja vidinį (angl. *intrinsic*) apoptotinį kelią, bet priklausomai nuo JS dozės bei ląstelių tipo gali būti aktyvuotas išorinis (angl. *extrinsic*) apoptotinis kelias arba nekroptozė (Kuribayashi *et al*. 2011). Pagrindiniai vidinio apoptotinio kelio dalyviai yra BCL (angl. *B-cell lymphoma*) šeimos baltymai, kurie reguliuoja mitochondrinės membranos pralaidumą ir pasižymi pro-apoptotinėmis ir anti-apoptotinėmis savybėmis. Įvykus viengrandiniam arba dvigrandiniam DNR trūkiui, vėžio supresorinis baltymas p53 kaupiasi ląstelės branduolyje ir skatina pro-apoptotinių BCL2 šeimos genų raišką (BBC3 (angl. *BCL2 Binding Component 3*); BAX (angl. *BCL2 associated X*); NOXA (angl. *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*). Šie genai didinant išorinės mitochondrinės membranos pralaidumą ir skatinant citochromo c praradimą sukelia ląstelės mirtį (Liu *et al*. 2014). Dėl JS poveikio ląstelėse taip pat susidaro laisvieji deguonies radikalai, kurie šalinant Ca^{2+} jonus sukelia mitochondrinės membranos potencialo praradimą, membranos pralaidumo didinimą bei citochromo c šalinimą iš mitochondrijos. Citozolyje citochromas c inicijuoja apoptosomos komplekso formavimąsi, kuris

yra būtinas kaspazių kaskados susidarymui. Aktyvuotos proteolitinės kaspazės kartu su kitomis proteazėmis sužadina daugybę įvairių ląstelinių komponentų, ko pasekoje įvyksta ląstelių žūtis (Hassan *et al*. 2014). Šį procesą silpnina citozolyje esantys šiluminio šoko baltymai HSP27, 70 ir 90 (angl. *heat shock protein* 27, 70, 90), kurie slopina apoptosomos formavimąsi. Todėl šie baltymai yra potencialūs priešvėžinės terapijos taikiniai norint įjautrinti ląstelės JS poveikiui (Patel *et al*. 2011; Straumer *et al*. 2012). Pastebėta, kad krūties, kasos bei plaučių vėžio atvejais ląstelėse yra padidėjusi apoptotinių baltymų slopiklių IAP (angl. *inhibitors of apoptosis proteins*) raiška (Wang *et al*. 2013; Finlay *et al*. 2017). Tiriant chondrosarkomos ląsteles *in vitro* parodyta, kad po poveikio skirtingomis JS dozėmis BCL-2, BCL-X_L (angl. *B-cell lymphoma-extra large*), cIAP2 (angl. *inhibitor of apoptosis protein 1*), XIAP (angl. *X-linked inhibitor of apoptosis*) ir Survivin apoptozės slopiklių raiška didėja, o šių genų išjungimas siRNR pagalba įjautrina vėžines ląsteles bei gali pagerinti radioterapijos gydymą (Kim *et al*. 2007; Galloway *et al*. 2009).

Radiacijos poveikio sukelta apoptozė taip pat vyksta „išorinio“ apoptotinio proceso metu. Nustatyta, kad paveikus peles turinčias neaktyvų „išorinį“ apoptotinį kelią jonizuojančiąja spinduliuote (JS), ląstelių apoptozė neįvyksta arba vyksta retai. „Išorinio“ apoptotinio kelio sukeltai ląstelių žūčiai daro įtaką naviko nekrozės faktoriaus receptoriai TNFR (angl. *tumor necrosis factor receptor*) (CD95 (angl. *cluster of differentiation 95*); DR5 (angl. *death receptor 5*); CD178; TNFRI (angl. *TNF receptor superfamily member 1A*; TRAIL1 (angl. *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand 1*); TRAILR1 (angl. *TRAIL receptor 1*) – „žūties receptoriai“). Šie žūties receptoriai jungiasi su savo ligandais ir formuoja žūtį-sukeliantį signalinį kompleksą (angl. *death-inducing signaling complex* (DISC)) sujungtą su FADD (angl. *Fas-associated death domain*), prokaspazėmis-8 ir -10. Kaspazė-8 yra pagrindinė „išorinio“ apoptotinio kelio kaspazė, kuri vykdo autokatalitinį savęs, o tuo pačiu ir kaspazių-3 ir -7 aktyvavimą. Pastarosios kaspazės, skeliant ląstelinius komponentus, sukelia neuždegiminę ląstelių mirtį (McIlvain *et al*. 2013; Panganiban *et al*. 2013). Manoma, kad apoptozės procese dalyvaujančių žūties receptorių aktyvinimas yra potencialus vėžio gydymo bei įjautrinimo JS būdai. Pavyzdžiui vėžio gydyme buvo bandyta naudoti TNF citokiną, kuris aktyvuoja kaspazių veiklą, taip aktyvinant apoptozės procesą. Deja, pastebėjus, kad TNF taip pat sukelia uždegiminius procesus, kurie aktyvina apoptozę slopinantį NFκB signalinį kelią, TNF aktyvinimas nėra naudotinas gydymo tikslais (Hassan *et al*. 2014). Tuo tarpu, TNF šeimos baltymai TRAIL ir FasL (angl. *Fas ligand*) aktyvina kaspazes, bet nereguliuoja NFκB (angl. *the nuclear factor NFκB*) signalinio kelio. Atlikti tyrimai su osteosarkomos ląstelėmis, kurie parodė, kad aktyvinus TRAIL ir veikiant JS – ląstelių apoptozės tikimybė didėja ir akivaizdžiai mažėja vėžinių ląstelių išgyvenamumas (Hori *et al*. 2010).

Nors ilgą laiką buvo manoma, kad nekrozė yra nekontroliuojama ląstelių žūtis, nauji tyrimai rodo, kad kartais nekrozė gali būti programuotos ląstelių žūties dalis vadinama nekroptoze. Pastebėta, kad nors radiacijos poveikis tiesiogiai nesukelia ląstelių nekroptozės, naudojant JS kartu su hipertermija yra įjungiamas nekroptozės signalinis kelias (Schildkopf *et al*. 2010; Meng *et al*. 2016). Naudojant dideles JS dozes pagrindinės kaspazių signalinės kaskados nėra aktyvinamos, bet formuojasi RIPK1/RIPK2 (angl. *receptor interacting protein kinase 1/2*) nekrosoma. Nekrosomoje kalpainas, katepsinas B/D ir apoptozę sukeliantis faktorius AIF (angl. *apoptosis-inducing factor*) inicijuoja užprogramuotos ląstelių nekrozės procesą: įvyksta greitas plazminės membranos plyšimas, organelių išbrinkimas bei viduląstelinių komponentų išsiliejimas, t.y. įvyksta uždegiminė ląstelių mirtis (Nehs *et al*. 2011; Kaczmarek *et al*. 2013).

1.1.4. Viengrandinių ir dvigrandinių DNR pažaidų taisymas

Gydymo sėkmė taikant radioterapiją dažnai priklauso nuo balanso tarp DNR pažaidų ir jų taisymo. Jei ląstelėje DNR pažeidimai yra tokie, kad energetiškai yra neverta juos taisyti, tai ląstelė apoptuoja. Priešingu atveju, vykdomas viengrandinių ir/ar dvigrandinių DNR trūkių taisymas (Alexander ir Walker 2010).

Įvykusius viengrandinius trūkius iš karto atpažįsta poli-ADP-ribozės polimerazė 1 PARP1, kuri pažeidimo vietoje sintetina poli-ADP-ribozės tinklus (Morales *et al*., 2014). Prie tokių tinklų susitelkia bazių iškirpimo reparacijos (angl. *base excision repair* (BER)) signalinio kelio baltymai APEX1 (angl. *apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease*), PNKP (angl. polynucleotide kinase/phosphatase), XRCC1 (angl. *X-ray repair cross-complementing protein 1*), DNR polimerazė β ir DNR ligazė α. Nepažeistos DNR galuose būna 5’- fosfato ir 3’- hidroksilo liekanos, tuo tarpu po jonizuojančiosios spinduliuotės poveikio 5’ gale dažniausiai būna deoksiribozės fosfato liekana, o 3’ – fosfato arba fosfoglikolato liekanos. Dėl šios priežasties pirmas viengrandinių galų reparacijos etapas yra DNR grandinės galų taisymas. Liazinis DNR polimerazės β aktyvumas yra atsakingas už deoksiribozės fosfato nuskėlimą 5’ gale, PNKP fosfatazė 3’ gale nuskelia fosfatą, o APEX1 nukleazė skelia fosfoglikolato liekaną (Sobol *et al*. 2000; Caldecott *et al*. 2008). Šie taisymai nebūtų įmanomi be XRCC1 baltymo, kuris palaiko aplinkinių fermentų kinazinį ir fosfatazinį aktyvumą bei tiesiogiai sąveikauja su PNKP ir DNR polimeraze β. Be to, tyrimai CHO (angl. *chinese hamster ovary*) ląstelėse turinčiose mutavusį XRCC1 geną (su „išjungta“ arba nuslopinta raiška), rodo, kad XRCC1 baltymo trūkumas įjautrina ląsteles genotoksinių agentų poveikiui, nes nėra pataisomi 5’- hidroksilo ir/ar 3’- fosfato DNR galai (Sossou *et al*. 2005; Abbotts ir Wilson 2017). Po 5’ ir 3’ liekanų pataisymo vyksta DNR plyšių užpildymas, t.y. vieno ar kelių trūkstamų nukleotidų sintezė pažeidimo vietoje. PARP1 ir

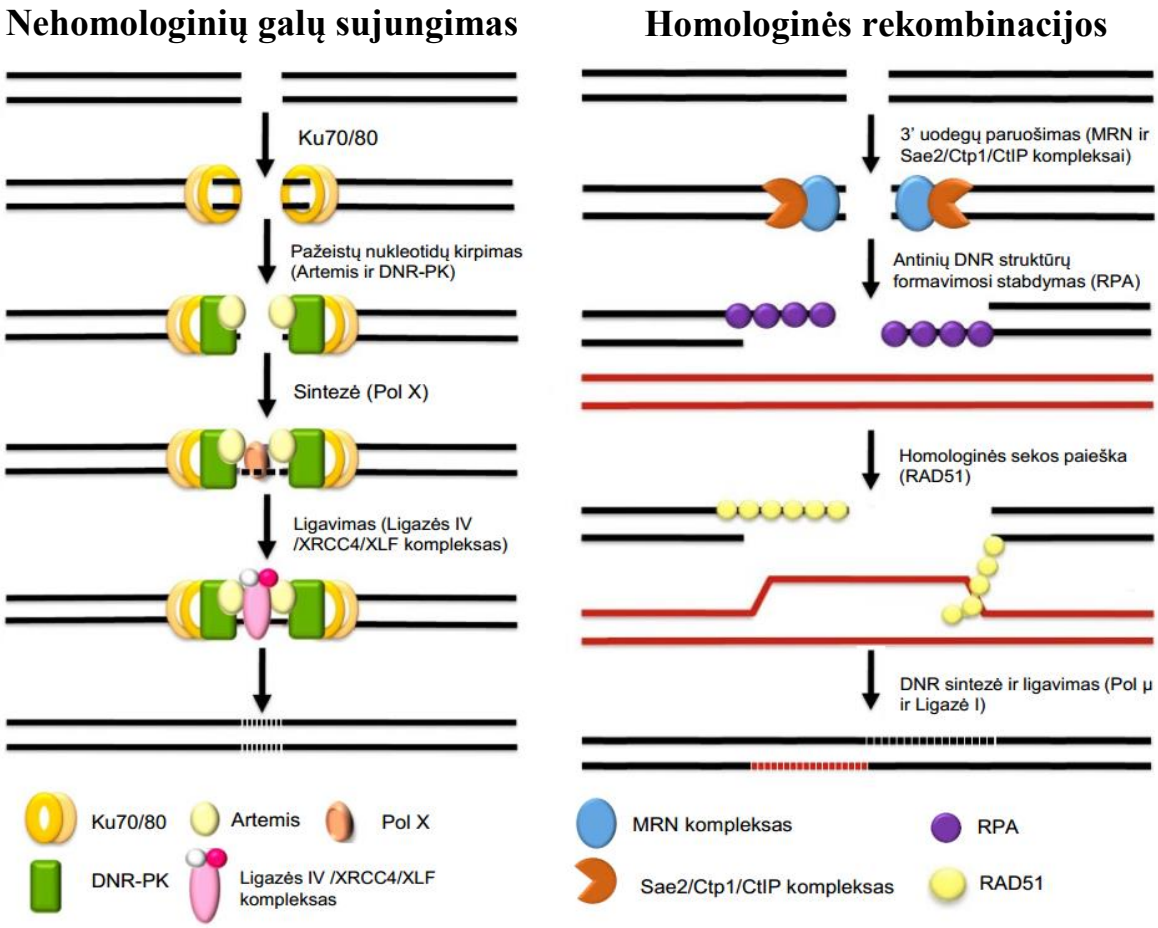
FEN (angl. *flap endonuclease 1*) stimuliuoja DNR polimerazės β aktyvumą, o RFC-PCNA kompleksas (angl. *replication factor C - proliferating cell nuclear antigen complex*) – polimerazės δ ir ε aktyvumą. Susintetinti nukleotidai DNR ligazės 1 ir ligazės 3 α pagalba prijungiami prie pažeistos DNR. *In vitro* tyrimai parodė, kad šios ligazės yra stabilios ir aktyvios tik esant XRCC1 ir PCNA baltymams (Sossou *et al*. 2005; Caldecott 2014).

Jeigu viengrandinis trūkis nebūna ištaisytas, tai S-fazėje replikacinė šakutė suyra ir pažeidimo vietoje susidaro dvigrandinis trūkis (Wang 2015).

Dvigrandinių trūkių taisymas dažniausiai vykdomas vienu iš dviejų mechanizmų: nehomologinių galų sujungimo (angl. *non-homologous end-joining* (NHEJ)) arba homologinių rekombinacijų (angl. *homologous recombinations* (HR)). Kitaip nei HR, NHEJ gali būti vykdomas visose ląstelės ciklo fazėse, todėl žinduoliuose šis taisymo mechanizmas yra sutinkamas dažniau (Mahaney *et al*. 2009; Lieber 2010). Nehomologinių galų sujungimas prasideda nuo Ku 70/80 heterodimerų prisijungimo prie DNR (2 pav.). Ku 70/80 yra žiedinės struktūros baltymas, kuris apsupa 3-4 pažeistos DNR nukleotidus. Prie tokio DNR-baltymo komplekso atkeliauja XRCC4 ir Cer-XLF (angl. *Cernunnos-X4-like factor*) baltymai, kurie padeda sujungti abu grandinės galus. Jeigu DNR galai yra komplementarūs ir nepažeisti, jie būna liguojami XRCC4-asocijuotos DNR ligazės IV pagalba. Jeigu 5’ ir/ar 3’ galai yra pažeisti – ligavimas nevykdomas. Šiuo atveju į pažeidimo vietą atkeliauja DNR protein-kinazės (DNR-PK), Artemis endonuklеazė ir Pol X šeimos polimerazės. DNR-PK fosforilintas Artemis nuskelia pažeistus nukleotidus, o polimerazės prijungia trūkstamus, padarant abu DNR galus komplementariais. NHEJ pataisas užbaigia prieš tai minėtoji DNR ligazė IV (Aparicio *et al*. 2014; Srivastava ir Raghavan 2015; Ray *et al*. 2018).

Homologinės rekombinacijos pagalba dvigrandinių trūkių taisymas vykdomas tik S arba G2 ląstelės ciklo fazėse. HR prasideda nuo 5’ galų nukirpimo paliekant 3’ DNR uodegas (2 pav.). Šį nukirpimą katalizuoja MRE11-RAD50-Xrs2/NBS1 kompleksas (MRN). Tačiau MRN kompleksas negali vykdyti kirpimo jei pažeistos DNR galai yra sunkiai prieinami, t.y. susidariusios plaukų segtuko struktūros arba prie DNR galų yra prijungti baltymai. Tokiu atveju prie pažeistos DNR atkeliauja Sae2/Ctp1/CtIP endonukleazės, kurios kartu su MRN kompleksu nukerpa nuo 50 iki 100 nukleotidų (Cannan ir Pedersom 2016; Andres ir Williams 2017). Prie sudarytų 3’ DNR uodegų prisijungia RPA (angl. *replication protein A*) baltymas. PRA stabdo antrinių DNR struktūrų susidarymą, taip palengvinant RAD51-DNR nukleofilamentų formavimąsi. RAD51 rekombinazė katalizuoja komplementarios DNR paiešką seserinėje chromatidėje, o ją suradus, padaro DNR D-kilpą. Seserinės chromatidės DNR tampa prieinama polimerazei μ – vykdoma donorinės DNR sintezė. Ligazės I pagalba donorinė DNR liguojama

prie pažeistos DNR 5’ galo ir viena grandinė tampa ištaisyta. Kitos grandinės sintezę ir ligavimą atlieka prieš tai minėtos polimerazės ir ligazės (Aparicio *et al*. 2014; Srivastava ir Raghavan 2015).



2 pav. Dvigrandinių trūkių taisymo schema. **Nehomologinių galų sujungimas** pradedamas Ku70/80 heterodimero prijungimu. Pažeisti DNR galai būna ištaisomi Artemis nukleazės ir DNR protein kinazės pagalba. Nukirptų nukleotidų sintezę vykdo X šeimos polimerazės, o ligavimą atlieka Ligazės IV/XRCC4/XLF kompleksas. **Homologinės rekombinacijos** prasideda, kai MRE11-RAD50-Xrs2/NBS1 ir Sae2/Ctp1/CtIP kompleksai suskaldo keliasdešimt nukleotidų 5’ galuose, paliekant 3’ uodegas. Prie išsikišusių DNR galų prisijungia RPA, kuris neleidžia susidaryti antrinėms DNR struktūroms bei padeda RAD51 rekombinazės prisijungimui. Pastaroji vykdo homologinės DNR paiešką seserinėje chromatidėje ir D-kilpos sudarymą. Donorinės komplementarios DNR sintezę atlieką Pol μ, o ligavimą – Ligazė I. (Paveikslas modifikuotas remiantis Srivastava ir Regvan, 2015 ir Cannan ir Pederson, 2016 duomenimis.)

Sinchronizuoti DNR pažaidų taisymo signaliniai keliai atlieka svarbų vaidmenį apsaugant ląsteles nuo genetinio nestabilumo ir mutacijų. Tačiau šie signaliniai keliai taip pat yra atsakingi už vėžinių ląstelių atsiradimą, migraciją ir išgyvenamumą, dėl ko sunku nustatyti, kurių DNR taisyme dalyvaujančių baltymų raiškos didinimas ar slopinimas galėtų pagerinti vėžio ligos gydymą (Srivastava ir Regvan 2015). Pavyzdžiui, potencialus vėžinių ląstelių įjautrinimo JS poveikiui taikinys yra viena pagrindinių NHEJ DNR kinazių PRKDC (angl. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*). Maža molekulė NU7441 yra PRKDC slopiklis, kuris sulėtina jo veiklą susijungdama su PRKDC, o tuo pačiu ir dvigrandinių trūkių taisymą. Krūties, kasos ir

prostatos vėžio atvejais lyginant radiaterpijos gydymą su kombinuotu NU7441-radioterapijos gydymu, pastarasis sumažina ląstelių išgyvenamumą iki 12 kartų (Ciszewski *et al*. 2014, Yu *et al*. 2015).

Homologinėse rekombinacijose dalyvaujantis MRN kompleksas yra kitas potencialus vėžinių ląstelių įjautrinimo JS poveikiui taikinys. Tam tikslui naudojamas adenovirusas Telomelizinas, kuris užkrėstose ląstelėse sintetina virusinį baltymą E1B66kDa, dėl ko įvyksta MRN komplekso degradacija. Ląstelėse nesant MRN kompleksui dvigrandiniai DNR trūkiai nėra pataisomi (Li *et al*. 2013). Šiuo metu vykdomi I/II fazės klinikiniai tyrimai su žmonėmis, kur vėžio ligos gydymui naudojama Telomelizino/radioterapijos kombinacija (NCT02293850 ir NCT03213054).

1.1.5. Jonizuojančiosios spinduliuotės sukelta autofagija

Šiandien yra žinoma, kad radioterapijos gydymas yra tiesiogiai susijęs su autofagijos proceso ląstelėse pradžia. Autofagija tai organelių virškinimo procesas dvimembraninėje puslelėje – autofagosomoje. Šį procesą po JS poveikio inicijuoja ULK1 (angl. *UNC51-like kinase 1*) kinazė, kuri kartu su BECN1 (angl. *Beclin-1*) ir PIK3C3 (angl. *phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3*) pradeda formuoti fagoforą aplink laisvaisiais radikalais sužalotas ląstelės dalis. PIK3C3 fosforilina lipidų fosfatidilinozitolį, taip fagoforo paviršiuje formuojant fosfatidilinozitolio 3-fosfatą. Prie tokio komplekso atkeliauja ATG ir WIPI (angl. *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*) šeimos baltymai ir suformuoja autofagosomos puslelę. Autofagosoma vėliau suliejama su lizosoma SNARE (angl. *SNAP (Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment protein) Receptor)* ir UVRAG (angl. *UV radiation resistance-associated gene*) baltymų pagalba ir pažeisti ląstelės komponentai yra „suvirškinami“ (Honscheid *et al*. 2014).

Manoma, kad autofagijos proceso reguliavimas radioterapijos metu galėtų sąlygoti didesnį laisvųjų radikalų kaupimąsi ląstelėse bei DNR pažaidų padaugėjimą. Tačiau iki šiol nėra žinoma, kada reikėtų autofagijos procesą slopinti, o kada aktyvinti. Autofagijos genų ATG5 ir BECN1 išjungimas padaro plaučių vėžines H460 ir A549 ląsteles jautresnias JS poveikiui, tuo tarpu šių genų išjungimas plaučių vėžinėse DKO ląstelėse padidina atsparumą (Ko *et al*. 2014; Sharma *et al*. 2014). Panašūs rezultatai gaunami atliekant tyrimus su glioblastomos ląstelėmis. Jose išjungiant prieš tai minėtus genus, T98G linijos ląstelės tampa jautresnės JS poveikiui, o U373MG ląstelių išgyvenamumas nekinta (Palumba *et al*. 2012). Šiandien iki galo dar nėra suprantamos autofagijos ir atsparumo radioterapijai sąsajos, tačiau tolimesni tyrimai šioje srityje

galėtų suteikti daugiau žinių apie tai, kaip geriau įjautrinti vėžines ląstelės įvairių genotoksinių agentų poveikiui (Tam *et al*. 2017).

1.1.6. Streso sukeltas ląstelių senėjimas

Po JS poveikio kaip alternatyvus apoptozei procesas gali įvykti ląstelių streso sukeltas priešlaikinis senėjimas (angl. *stress-induced premature senescence* (SIPS)). Spinduliuotė aktyvuoja p53 ir p21 genus ir ilgainiui gali sustabdyti ląstelės ciklą G1 fazėje. Manoma, kad senėjimo procesas padeda vėžinėms ląstelėms pasprukti nuo radiacijos sukeltos žūties. Šios vėžinės ląstelės stabdo ląstelės ciklą, bet išlieka gyvos bei metaboliškai aktyvios. Jos geba išskirti naviko augimą skatinančius veiksnius bei pačios gali supiktybėti ar net virsti vėžinėmis kamieninėmis ląstelėmis praėjus mėnesiams ar net metams po radioterapijos gydymo (Sabin ir Anderson 2011; Leikam *et al*. 2015).

Žinoma, kad didelės chemoterapinių vaistų ar JS dozės aktyvuoja ląstelės apoptotinius procesus, tuo tarpu mažos – sukelia priešlaikinį ląstelių senėjimą. Mažos vaistų koncentracijos nekeičia arba silpnai pakeičia sveikų ląstelių augimo profilį, tuo tarpu tos pačios koncentracijos sustabdo vėžinių ląstelių augimą. Kadangi priešlaikinis streso sukeltas senėjimas pasižymi dvigubu poveikiu – slopina vėžinių ląstelių augimą, bet kartu ir padidina vėžio piktybėjimo tikimybę, tai iki šiol nėra aišku, kaip šį procesą galima panaudoti priešvėžinės terapijos gydyme (Lee ir Lee 2014). Atliekant tyrimus su plaučių vėžinėmis ląstelėmis turinčiomis nuslopintą MDM2 (angl. *mouse double minute 2*) baltymo veiklą, pastebėta, kad tokios ląstelės yra jautresnės JS poveikiui nei ląstelės su veikliu MDM2. Mokslininkai MDM2 slopinimui panaudojo mažą Nutlin-3a molekulę, ko pasekoje stabilizavosi vėžio supresoriaus p53 veikla bei įvyko p21 geno aktyvacija. Paveikus tokias ląsteles 2-6 Gy JS doze, jose iš karto paleidžiami priešlaikinio senėjimo procesai. Pasenusios vėžinės ląstelės neauga ir nesidalina, tačiau ir nemiršta, o tokių ląstelių sankaupos išskiria padidėjusius kiekius uždegiminių citokinų, dėl ko gali įvykti su senėjimu susiję pokyčiai ar antrinio vėžio atsiradimas (Luo *et al*. 2013).

1.2. PARP genų svarba vėžinių ląstelių atsake į JS poveikį

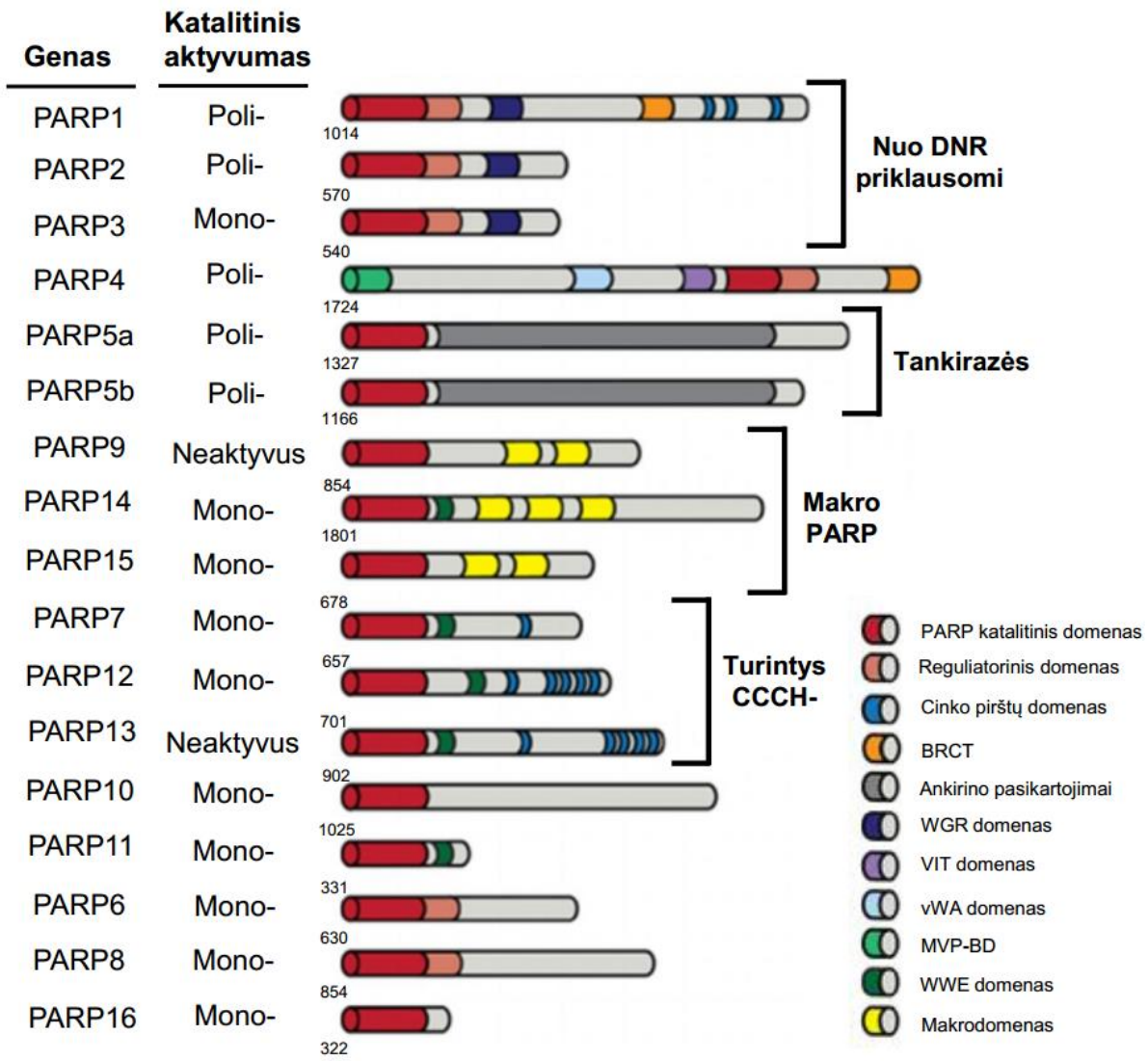
Poli-ADP-ribozės polimerazės (PARP) – fermentų šeima katalizuojanti ADP-ribozės prijungimą prie įvairių baltymų. Šie fermentai dalyvauja daugelyje ląstelinių procesų: chromatino struktūros moduliavime, transkripcijoje, replikacijoje, rekombinacijoje bei DNR pažaidų taisyme. Dėl šių priežasčių mokslininkai skiria vis didesnį dėmesį šios šeimos baltymams.

1.2.1. PARP genų reguliuojamas DNR pažaidų taisymas

PARP šeimą sudaro 17 skirtingų baltymų (3 pav.), iš kurių pirmas nustatytas bei geriausiai išnagrinėtas yra PARP1. Šis baltymas veikia kaip viengrandinių DNR trūkių jutiklis bei dalyvauja bazių iškirpimo reparacijos, nukleotidų iškirpimo reparacijos ir, rečiau, nekomplementarių nukleotidų reparacijos procesuose (angl. *DNA mismatch repair*). PARP1 funkcija bazių iškirpimo reparacijos procesuose detaliau apibūdinama 1.1.4 skyriuje. Nukleotidų iškirpimo reparacijos atveju PARP1, poli-ADP ribozilinant XPC/HHRAD23B kompleksą, sąlygoja jo prisijungimą prie pažeistos DNR (Maltseva *et al*. 2015). Prie komplekso priartėja transkripcijos faktoriai IIH (TFIIH), XPA (angl. *xeroderma pigmentosum group A-complementing protein*) ir RPA1 (angl. *replication protein A1*). TFIIH atskiria dvi DNR grandines, o XPA ir RPA jas stabilizuoja. Kadangi veiklus XPA baltymas yra poli-ADP ribozilintas, tai manoma, kad netiesiogiai PARP1 irgi dalyvauja DNR stabilizavime (Fu *et al*. 2012). Prie stabilizuotos pažeistos grandinės 3’ ir 5’ galų atitinkamai prisijungia XPG ir RPA endonukleazės ir nukerpa 23-30 nukleotidų fragmentą. Aplinkoje esant PCNA, RPA ir RFC faktoriams δ ar ε DNR polimerazės pagalba vykdomas nukirpto fragmento atstatymas (Ko ir Ren 2012).

Nekomplementarių nukleotidų reparacijos metu netinkanti bazė atpažįstama MUTSα (MSH2-MSH6 heterodimero ir MUTLα (PMS2-MLH1 heterodimero) pagalba. Kadangi aktyvus MSH2 (angl. *DNA mismatch repair protein Msh2*) turi poli-ADP ribozės liekaną, manoma, kad šio pažeidimo nustatyme taip pat dalyvauja PARP1 baltymas. Prie heterodimerais pažymėtos DNR atkeliauja EXO1 nuklеazė, kuri iškerpa netinkantį nukleotidą, o jo vietoje δ ar ε DNR polimerazės sintetina naujus komplementarius nukleotidus (Liu *et al*. 2011).

Ilgą laiką buvo manyta, kad PARP1 dalyvauja tik viengrandinių trūkių atpažinime bei taisyme, tačiau pastarųjų metų tyrimai rodo, jog PARP baltymai taip pat reguliuoja dvigrandinių trūkių taisymo procesus. PARP1 reguliuoja homologinės rekombinacijos procese dalyvaujančio MRE11 (angl. *meiotic recombination 11*) baltymo aktyvumą, o jo sukeltas poli-ADP ribozilinimas padidina DNR-PK aktyvumą (Gagne *et al*. 2008). Be to, PARP1 veikia kaip transkripcijos faktorius keičiantis daugelio baltymų raišką. PARP1 reguliuoja SP1 (angl. *specificity protein 1*), Oct-1 (angl. *ubiquitous octamer-binding 1*), SOX2 (angl. *sex determining region Y-box 2*) ir hnRNP K (angl. *heterogeneous nuclear riboncleoprotein K*) transkripcijos faktorių raišką, t.y. PARP1 netiesiogiai dalyvauja tokiuose procesuose kaip ląstelių kamieniškumo būsenos palaikymas, diferenciacija, augimas, apoptozė ir imuninis atsakas, kurie irgi gali būti siejami su atsaku į JS bei atsparumo genotoksiniams agentams įgavimu (Gao *et al*. 2009; Ko ir Ren 2012).



3 pav. Žmogaus PARP baltymų domeninė organizacija ir katalitinis aktyvumas. BRCT: BRCA1 C galo domenas; VIT (angl. *vault inter-trypsin domain*); vWA: von Willebrand A tipo faktorius; MVP-BD (angl. *major vault protein binding domain*). Prie domenų esantys skaičiai parodo baltymo ilgį amino rūgštimis. Paveikslas sukurta pagal Daugherty *et al*. 2014.

Kitų PARP šeimos narių funkcijos yra mažiau išnagrinėtos, tačiau nustatyta, kad PARP2 ir PARP3 vykdo bazių iškirpimo reparaciją (angl. *base excision repair* (BER)), nukleotidų iškirpimo reparaciją (angl. *nucleotide excision repair* (NER)), nehomologinių galų sujungimą (angl. *non-homologous end joining* (NHEJ)) ir homologines rekombinacijas (angl. *homologous recombinations* (HR)) dalyvaujančių baltymų poli- ir mono-ADP ribozilinimus, taip reguliuojant jų aktyvumą (Kutuzov *et al*. 2014). Įdomu, kad PARP12 skatina DNR galų sujungimą nenaudojant savo poli-ADP ribozilinimo katalitinės funkcijos. Jis, iki šiol nežinomais būdais, nuo DNR atitraukia galų sujungimo bloką – 53BP1, taip atlaisvindamas priėjimą CtIP ir MRN kompleksui (Fouquin *et al*. 2017). Taip pat pastebėta, kad kai kurie PARP šeimos atstovai turi katalinius

domenus, tačiau jie būna neaktyvūs. Tokie yra PARP9 ir PARP13 (Feij *et al*. 2013; Vyas *et al*. 2013). PARP9 raiška siejama su ląstelių migracija, o PARP13 turi cinko pirštų domeną reguliuojantį RNR apdorojimą bei splaisingą. Iki šiol PARP9 ir PARP13 nebuvo siejami su atsaku į DNR pažaidas ar su DNR pažaidų taisymo procesais, tačiau paskutiniai tyrimai atlikti Nacionalinio vėžio institute molekulinės onkologijos laboratorijoje parodė, kad paveikus kolorektalinio vėžio ląsteles skirtingomis JS dozėmis padidėja jų raiška (Stankevicius *et al*. 2017). Be to, dvi PARP13 izoformos PARP13.1 ir PARP13.2, kartu su PARP5a, PARP12, PARP14, PARP15 yra susikaupusios citoplazminėse, nemembraninėse struktūrose – streso granulėse, atsirandančiose esant virusinei infekcijai, osmotiniam šokui, okcidaciniam stresui arba reaktyvių deguonies formų padaugėjimu (Leung *et al*. 2011; Moutaoutfik *et al*. 2014; Catara *et al*. 2017). Nors PARP1 sąsajos su naviku ir DNR pažaidų taisymu yra žinomos, apie kitus PARP baltymus informacijos yra nedaug, o jie gali būti potencialiais priešvėžinių terapijų taikiniais.

1.2.2. PARP slopinimas ir vėžio gydymas

Pirmieji PARP slopikliai (benzamidas ir 3-aminobenzamidas buvo aprašyti jau 1984 metais. Jie slopina poli-ADP ribozės sintezę, taip sulėtindami DNR pažaidų taisymus. Tačiau efektyviam slopinimui reikalingos didelės šių slopiklių koncentracijos, dėl šios priežasties tyrimai sustojo *in vitro* lygmenyje. Be to, šie slopikliai taip pat paveikia ir kitus ląstelinius procesus, kuriuos sunku kontroliuoti (Milam ir Cleaver 1984). Nuo to laiko buvo sukurta daug naujų PARP slopiklių, iš kurių trys jau naudojami vėžio gydyme. JAV maisto ir vaistų administracija (FDA) per paskutinius keturis metus patvirtino olaparib, rucaparib ir niraparib naudojimą kiaušidžių vėžio gydymui (Bitler *et al*. 2017).

Tyrimai su PARP slopikliais parodė, kad sumažinus PARP genų raišką, ląstelės tampa jautresnės jonizuojančiajai ir UV spinduliuotėms bei įvairiems citotoksiniams vaistams. Pastebėta, kad neveiklius PARP1 arba PARP2 genus turinčios pelės yra ypač jautrios JS poveikiui. PARP slopikliai pagerina vėžio gydymo terapinį efektyvumą bei sumažina šalutinių poveikių atsiradimo tikimybę. Vienas pagrindinių chemoterapinio vaisto deksorubicino šalutinių poveikių yra kardiotoksiškumas (pablogėja širdies veikla). Pelės turinčios nuslopintą arba išjungtą PARP1 geną po poveikio deksorubicinu turi normalias laktato dehidrogenazės koncentracijas kraujyje, jų kreatino kinazių aktyvumas širdyje stabilus ir jos pasižymi didesniu išgyvenamumu lyginant su pelėmis turinčiomis veiklų PARP1 (Pacher *et al*. 2006). Panašūs rezultatai gaunami tiriant cisplatinos šalutinį poveikį (nefrotoksiškumą). Gyvūnams turintiems išjungtą arba nuslopintą PARP cistplastina padaro mažesnę histopatologinę žalą, o jo terapinis efektas išlieka nepakitęs. Kadangi daugiausia tyrimų yra atlikta tik su PARP1 ir PARP2, tai papildomi tyrimai apimantys

kitus PARP šeimos narius galėtų būti perspektyvūs priešvėžinių vaistų paieškoje (Mukhopadhyay *et al*. 2011).

1.3. Vėžio kamieninės ląstelės

Vėžio kamieninėmis ląstelėmis (VKL) (angl. *cancer stem cells*) yra vadinama tokia vėžinių ląstelių populiacija, pasižyminti pakitusiais ląstelės ciklo ir ląstelės programuotos mirties reguliaciniais mechanizmais bei turinti visas kamieninėms ląstelėms (KL) būdingas savybes (Reya *et al*. 2001).

Pirmą kartą VKL egzistavimas buvo aprašytas 1937 metais. Mokslininkai pastebėjo, kad injekavus pavienes leukemijos vėžines ląsteles į peles tik nedidelė dalis gyvūnų susirgdavo leukemija. Taip jie iškėlė hipotezę, kad ne visos vėžinės ląstelės pasižymi geromis „reprodukcinėmis“ sąvybėmis, bet yra „unikalios“ ląstelės, kuriose šios savybės yra stipriai išreikštos (Buczacki 2016). Daugiau nei 60 metų VKL hipotezė buvo vangiai nagrinėjama, kol 1997 metais Bonnet ir Dick šią hipotezę sugebėjo patvirtinti. Jie nustatė, kad, tik 0.01-1% žmogaus ūminės mieloidinės leukemijos (ŪML) ląstelių transplantuojamų į nenutukusias diabetines/sunkų imuniteto nepakankamumą turinčias peles, sukelia ŪML (Bonnet ir Dick 1997). Tokios ląstelės buvo praturtintos CD34 paviršiniais antigenais bei turėjo sumažintą arba visiškai sustabdytą CD38 antigeno raišką. CD34+/CD38- fenotipas būdingas ne tik VKL, bet ir KL, todėl abi ląstelų populiacijos yra daugiagalės (angl. *multipotent*) ir turi platų diferenciacijos potencialą (Jiang *et al*. 2016). Šiandien VKL yra randamos įvairiose vėžio tipuose: gaubtinės žarnos, plaučių, krūties, kiaušidžių, smegenų, odos ir kt. (Liu ir Lathia 2016).

1.3.1. Kolorektalinio vėžio KL biožymenys

Vėžinių kamieninių ląstelių biožymenų identifikavimui naudojami du metodai: fluorescencijos pagalba aktyvuotų ląstelių rūšiavimas (FACS) (angl. *fluorescence-activated cell sorting*) ir jų ksenotransplantavimas į imunosupresuotas peles (Buczacki, 2016). Šiais metodais nustatytas ne vienas VKL būdingas žymuo (1 lentelė). Nors įvairiuose vėžio tipuose šie biožymenys sutampa, universalių biožymenų rinkinių visų VKL nustatymui iki šiol nerasta (Romano *et al*. 2015).

Vienas iš pirmųjų nustatytų biožymenų kolorektaliniam vėžiui yra prominin-1 glikoproteinas, kitaip CD133. Šis baltymas randamas plazminėje membranoje, o jo raiškos pokyčiai siejami su ląstelės diferenciacija. Taip pat yra manoma, kad CD133 atlieka pagrindinį vaidmenį kamieniškumo savybių palaikyme ir siejamas su atsparumu 5-fluoruracilo

chemoterapijai ir radioterapijai atsiradimu bei prasta ligos prognoze, didesne metastazių tikimybe (Cherciu *et al*. 2014). CD133 žymuo randamas daugelyje vėžio tipų ir naudojamas identifikuoti kolorektalinį plaučių, krūtų, kiaušidžių ir skrandžio vėžį (Liu ir Lathia 2016).

Labiausiai paplitęs ir daugumoje vėžio tipų randamas VKL žymuo yra aldehid-dehidrogenazė-1 (ALDH1) (1 lentelė). Šis baltymas negrįžtamai katalizuoja alifatinių ir aromatinių aldehidų oksidaciją, todėl ALDH1 raiškos didėjimas apsaugo VKL nuo oksidacinių pažaidų bei suteikia atsparumą alkilinantiems chemoterapiniams agentams (Chen *et al*. 2015).

1 lentelė. Skirtinguose vėžio tipuose randamų VKL žymenys. Su kolorektaliniu vėžiu sutampantys žymenys yra pabraukti.

Vėžys	Žymenys	Literatūros šaltiniai
Kolorektalinis	**CD24**, CD29, **CD44**, **CD133**, **CD166**, **ALDH-1**, **BMI-1**, CDX-2, Dclk1, **EpCAM**, **Lgr5**, Msi-1, Olfm4, **β-catenin**	Khalek *et al*. 2010; Vaiopoulos *et al.* 2012; Cherciu *et al*. 2014;
Plaučių	**CD44**, CD87, CD90, CD117, **CD133**, **CD166**, **ALDH1**, **BMI-1**, **EpCAM**, FZD, KRAS, PODXL-1, PTCH, SP, **β-catenin**,	Miyata *et al*. 2015; Hardavella *et al*. 2016;
Krūties	**CD24**, **CD44**, CD61, **CD133**, **ALDH1**, DLL1, DNER, ESA, ITGA6,	Ali *et al*. 2011; Gokmen-Polar *et al*. 2011; Hwang-Verslues *et al.* 2012; La ir Zapperi 2013
Kiaušidžių	**CD24**, **CD44**, CD117, **CD133**, **ALDH1**, **EpCAM**	Burgos-Ojeda *et al*. 2012; Zhan *et al*. 2013; Lin ir Ding 2017;
Skrandžio	**CD44**, **CD133**, **ALDH1**, ABCB1, ABCG2, **Lgr5**	Brungs *et al*. 2016; Wang *et al*. 2016
Melanoma	CD20, CD34, **CD44**, CD271, ABCB5, **ALDH1**, JARID1	Parmiani 2016; La ir Zapperi 2013; Erfani *et al*. 2016
Leukemija	CD13, CD25, CD32, CD33, CD34, CD38, **CD44,** CD47, CD96, CD123, **ALDH1, BMI1,** CLL-1, HCK, HDAC, HIF-1α, NF-κB, TIM3, WT1, **β-catenin**	Bonnet ir Dick 1997; Hosen et al. 2007; Rhenen et al. 2007; Majeti et al. 2009; Saito et al. 2010; Jan et al. 2011; Goardon et al. 2011; Horton ir Huntly 2012; Ding et al. 2017

Transmembraninis baltymas CD44 naudojamas kaip biožymuo visiems „solidiniams“ (angl. *solid tumor*) navikams identifikuoti. Šis baltymas atlieka adhezines funkcijas ir susijungdamas su savo ligandu – hialurono rūgštimi, palaiko ląstelės-ląstelės ir ląstelės-tarpląstelinio užpildo sąveikas. Be to, CD44 dalyvauja tirozino kinazės receptoriaus c-Met (angl. *tyrosin-protein kinase Met*) aktyvavime, todėl jo raiška yra svarbi vėžinių ląstelių kamieniškumo palaikyme (Du *et al*. 2008). CD44 kaip biožymuo dažnai naudojamas kartu su CD24, kurį VKL

sintetina mažai/nesintetina, arba su padidėjusią raišką turinčiais CD166 ir EpCAM (angl. *epithelial cellular adhesion molecule*) genais (Hardavella *et al.* 2016; Liu ir Lathia 2016). Pastebėta, kad VKL CD44 geno raiška yra padidėjusi, tačiau šio baltymo raiškos sumažinimas siejamas su vėžio piktybėjimu ir metastazių tikimybės padidėjimu (Dallas *et al*. 2012), todėl CD44 kaip potencialus taikinys priešvėžinėms terapijoms nenaudojamas.

CD44 raiška yra reguliuojama β-kateninu per Wnt/β-katenino signalinį kelią. Wnt/β-katenino signalinio kelio pagrindinė molekulė β-kateninas yra ypatingai svarbi kolorektalinių VKL vystymesi bei atsparumo terapijoms įgavime. Nors Wnt/β-katenino signalinis kelias taip pat dalyvauja sveikų kamieninių ląstelių vystymosi metu, bet jis nėra svarbus KL savęs-atsinaujinimo procese todėl gali būti naudojamas ne tik kaip biožymuo, bet kaip potencialus terapijų taikinys (Ding *et al*. 2017).

Integrinų šeimos baltymas CD29 aktyvuoja signalines molekules ir signalinius kelius reguliuojančius ląstelių migraciją, proliferaciją, išgyvenamumą, diferenciaciją ir mirtį. Kartu su E-kadherinu CD29 palaiko ląstelės-ląstelės ir ląstelės-kolageno sąveikas, dėl ko ląstelės išlieka diferencijuotos. Dėl šių priežasčių CD29 baltymo raiškos mažėjimas siejamas su diferencijuotų vėžinių ląstelių virsmu į nediferencijuotas, t.y. į VKL ir atsparumo chemo- ir radioterapijoms įgijimu (Langan *et al*. 2013).

Kitas potencialus kolorektalinių VKL biožymuo yra prie mRNR besijungiantis Msi-1 baltymas. Reguliuojant įvairių baltymų transliacijas Msi-1 palaiko savęs atsinaujinimo savybes bei nediferencijuotą ląstelės būseną (Espersen *et al*. 2015).

Kolorektalinio vėžio KL turi padidėjusią Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1*), CDX-2 (angl. *caudal type homeobox 2*), Dclk1 (angl. *doublecortin like kinase 1*) ir Lgr5 (angl. *leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5*) baltymų raišką. Jie reguliuoja ląstelės proliferacijos ir diferenciacijos mechanizmus, skatina metastazių formavimąsi bei siejami su prastomis ligos prognozėmis (Vaiopoulous *et al*. 2012), todėl gali būti naudojami kaip biožymenys ligos diagnostikoje.

Nors yra surasta nemažai VKL biožymenų, nėra nei vieno, kuris vienareikšmiškai nustatytų tam tikrą VKL populiaciją. Kartais tas pats biožymuo randamas ne tik VKL, bet ir įprastose vėžinėse ląstelėse, sveikose ląstelėse arba tiesiog KL (Buczacki 2016). Todėl greitai diagnostikai ir patikimam gydymui svarbu ieškoti naujus biožymenys ir potencialius priešvėžinių terapijų taikinius.

1.3.2. Vėžinių kamieninių ląstelių sąsajos su atsparumo JS poveikiui įgavimu

Vėžinės kamieninės ląstelės atlieka svarbų vaidmenį naviko vystymosi bei ligos atsinaujinimo po gydymo metu. Nustatyta, kad radioterapijos bei kitų priešvėžinių terapijų sėkmė didžiąja dalimi priklauso nuo naviko struktūroje VKL populiacijos dydžio. Manoma, kad VKL pasižymi didesniu atsparumu genotoksiniams agentams nei vėžinės ląstelės (Krause *et al*. 2017). 2006 metais atlikti tyrimai vieni pirmųjų įrodantys padidėjusį VKL atsparumą JS poveikiui. Mokslininkai lygino vienkartine JS doze veiktų laukinio tipo plaučių vėžinių ląstelių išgyvenamumą su $CD24^{-}/CD44^{+}$ plaučių vėžinių ląstelių išgyvenamumu. Pastebėta, kad po poveikio JS 2 Gy doze ląstelių turinčių VKL būdingus žymenys išgyvenamumas siekė net 50 %, tuo tarpu laukinio tipo vėžinių ląstelių – tik 20 % (Phillips *et al*. 2006). Atsparumas radioterapijos poveikiui gali atsirasti dėl : 1) VKL efektyviau šalina reaktyvias deguonies formas; 2) turi sulėtintą ląstelės ciklą; 3) turi pakitusius DNR pažaidų taisymo mechanizmus.

Kaip jau buvo minėta praeituose skyriuose, pagrindinė vėžinių ląstelių mirties priežastis po JS poveikio yra reaktyvių deguonies formų (ROS) atsiradimas. ROS yra atsakingi ne tik už ląstelių mirtį, bet ir atlieka svarbų fiziologinį vaidmenį ląstelių diferenciacijos metu, metabolizme, ląstelių tarpusavio adhezijos procesuose bei ląstelių migracijoje. Be to, ROS ląstelėse veikia kaip signalinės molekulės aktyvuojančios MAPK-Erk, PI3K-Akt kaskadas, IκB kinazių-NFκB ir Src-priklausomą signalinius kelius (Liou ir Storz 2010). Viduląstelines ROS koncentracijas kontroliuoja įvairūs fermentai: superoksido dismutazė, superoksido reduktazė, katalazė, glutationo peroksidazė, glutationo reduktazė bei daugiafunkcinis APEX1 baltymas. Pastebėta, kad VKL turi padidėjusius šių fermentų raiškos lygius (Skvortsov *et al*. 2015). Daugiausia susidomėjimo sukėlė APEX1 baltymas, kadangi jis ne tik dalyvauja ROS šalinime, bet kartu ir DNR pažaidų taisyme (1.4 skyrius). Lou su kolegomis parodė, kad naudojant APX3330 inhibitorių yra slopinama APEX1 baltymo veikla gaubtinės žarnos vėžinėse kamieninėse ląstelėse. Tokių ląstelių augimo greitis sumažėjo kelis kartus bei jos tapo daug jautrenės genotoksinių vaistų poveikiui (Lou *et al*. 2014).

Kaip ir paprastos KL, taip ir VKL ilgam laikui gali sulėtinti/sustabdyti ląstelės ciklą. Tokios ląstelės yra vadinamos „miegančiomis“ (angl. *quiescent*). Jos ilgą laiką būna G0 fazėje, tačiau esant išoriniams stimuliatoriams gali pratęsti normalią ląstelės ciklo veiklą (Cheung ir Rando 2013). Kadangi VKL turi sulėtintą/sustabdytą ląstelės ciklą, visos standartinės vėžio gydymo terapijos, žudančios greitai besidalijančias ląsteles, yra neveiksmingos. Manoma, kad „miegančių“ ląstelių būseną labiausiai kontroliuoja Notch signalinio kelio baltymai. Tyrimai su melanomos ląstelėmis parodė, kad išjungus histono 3 demetilazės geną JARID1B (angl. *Jumonji*

AT rich interactive domain), pakinta Notch signalinio kelio veikla, VKL diferencijuoja, sumažėja metastazių tikimybė bei sulėtėja naviko augimas (Roesch *et al*. 2010).

Nustatyta, kad VKL kaip ir embrioninės KL ar suaugusio organizmo KL daug efektyviau vykdo DNR pažaidų taisymą nei diferencijuotos ląstelės (Wang 2015). Pagrindinė to priežastis yra stipriai padidėjusi BER, NER, NHEJ ir HR procesuose dalyvaujančių baltymų raiška (Vitale *et al*. 2017). Tiriant glioblastomos ligą inicijuojančias (angl. *glioblastoma-initiating*) VKL, pastebėta, kad šiose ląstelėse DNR pažaidų taisymas priklauso nuo PARP šeimos baltymų, Naudojant PARP slopiklį ir JS kombinuotą terapiją glioblastomos VKL praranda kamieniškumo savybes, pradeda diferencijuoti bei žūti (Venere *et al*. 2014).

VKL atsparumo radioterapijai formavimui bei kitoms priešvėžinėms terapijoms didelę įtaką turi šių ląstelių mikroaplinka. Paprastai VKL mikroaplinką sudaro stromos ląstelės, imuninės sistemos ląstelės, tarpląstelinis užpildas, ląstelių išskyriamos signalinės molekulės (FGF (angl. *fibroblast growth factor*); TGF-β (angl. *transforming growth factor beta*); PDGF (angl. *platelet-derived growth factor*); interleukinai) bei įvairūs kiti metabolitai. (Lau *et al*. 2017). Naviko stromą sudaro su vėžiu susiję fibroblastai (angl. *cancer-associated fibroblasts* (CAFs)). CAFs nuo įprastų fibroblastų skiriasi tuo, kad turi padidėjusią augimo veiksnių, proteazių bei tarpląstelinio užpildo molekulių sekreciją. Nustatyta, kad CAFs išskiria hepatocitų augimo veiksnį (HGF), kuris aktyvuoja Wnt/β-katenino bei Notch signalinius kelius, taip palaikydamas VKL kamieniškumo būseną. Pastebėta, kad HGF turi įtakos kamieniškumo palaikyme ir vystymesi (Vermeulen *et al*. 2010; Lau *et al*. 2016). Mikroaplinkoje esančios imuninės ląstelės dažnai slopina naviko augimą, tačiau yra ir tokių imuninių ląstelių subpopuliacijos, kurios skatina naviko vystymąsi. Pavyzdžiui, M2 tipo makrofagai inaktyvuoja imunines T ląsteles, sintetina tarpląstelinio užpildo komponentus, turi įtakos audinių regeneracijai bei skatina angiogenezę. Tokie makrofagai sąveikaudami su VKL aktyvina EphA4 (angl. *ephrin type-A receptor 4*) receptorių, slopina Src ir NF-κB signalinius kelius bei skatina VKL atsinaujinimą (Lu *et al*. 2014). Be to, M2 makrofagai išskiria EGF-8 (angl. *epithelial growth factor*) augimo faktorių, kuris aktyvina STAT3 ir Hedgehog signalinius kelius ir sustiprina VKL atsparumą genotoksinių agentų poveikiui (Jinushi *et al*. 2010).

Dažnai naviko mikroaplinkoje susidaro hipoksinės sąlygos, kurios iš visų fizikocheminių veiksnių daro didžiausią įtaką atsparumo vėžio gydymo terapijoms vystymuisi. Esant hipoksinėms sąlygoms sparčiai didėja HIFs (angl. *hypoxia-indued factors*) genų raiška. Yra žinoma, kad didėjant HIFs raiškai didėja ir kamieniškumo biožymenų–genų raiška. Pavyzdžiui, šlapimo pūslės vėžio atveju HIF-1α raiškos padidėjimas siejamas su CD44 kamieniškumo geno raiškos padidėjimu, o prostatos atveju – su SOX2 raiškos padidėjimu (Bae *et al*. 2016;

Koukourakis *et al*. 2016). Li su bendraautoriais parodė, kad sumažinus HIF-1α raišką, krūties vėžinės ląstelės tampa jautresnėmis chemoterapiniam bei radioterapiniam poveikiui (Li *et al*. 2015).

Kadangi VKL turi didžiulę įtaką atsparumo JS poveikiui vystymuisi, tai pagrindinis priešvėžinių terapijų tikslas turėtų būti VKL šalinimas.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai ir tirpalai

1. 96 % etanolis („Vilniaus degtinė“, Lietuva);
2. 99,9 % metanolis („Sigma-Aldrich“, JAV);
3. Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) („Thermo Scientific“, Lietuva);
4. Tripsinas („Biochrom“, Vokietija);
5. „Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix“ („Thermo Scientific“, JAV);
6. „GlutaMAX™ Supplement“ („Thermo Scientific“, JAV);
7. Low-melting agarozė („ROTH“, Vokietija);
8. RNase-Free vanduo („Thermo Scientific“, JAV);
9. TrypLE™ (rekombinantinis tripsinas) („Thermo Scientific“, JAV);
10. Streptomicinas-penicilinas („Sigma-Aldrich“, JAV);
11. Fetalinis jaučio serumas (angl, *fetal bovine serum* (FBS)) („Biochrom AG“, Vokietija);
12. Kristalinio violeto dažas 0,5 % (N-[4-[bis[4-(dimetilamino)-fenil]metilen]-2,5-cikloheksadien1-ilidin]-N-metilmetanaminochloridas) („Sigma-Aldrich“, JAV);
13. Natrio piruvatas („Sigma-Aldrich“, JAV);
14. Hemocitometrinė skaičiavimo kamera („Kisker-Biotech“, Vokietija).

2.1.2. Rinkiniai

1. TL-PGR rinkinys „KAPA SYBR® FAST qPCR kit Master Mix (2X) Universal“ („KAPA BIOSYSTEMS“, JAV);
2. RNR skyrimo rinkinys „Quick-RNA™ MiniPrep“ („ZYMO RESEARCH“, JAV);
3. Kopijinės DNR sintezės rinkinys „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Scientific, JAV).

2.1.3. Laboratorinė įranga

1. Centrifugos – „Centrifuge 5424“ („Eppendorf“, Vokietija); „Centrifuge 5430“ („Eppenorf“, Vokietija); „Centrifuge 5810R“ („Eppendorf“, Vokietija);
2. Gradientinis termocikleris – „Labcycler“ („SensoQuest“, Vokietija);
3. Laminarinė spinta – „CLASSII BSC“ („ESCO“, JAV);

4. Mikroskopas – „Nikon ECLIPSE TS100“ („NIKON“, Japonija);
5. Mini-centrifuga – „Combi-Spin FVL-2400N“ („BIOSAN“, Latvija);
6. TL-PGR aparatas – „Eco Real-Time PCR Thermocycler“ („Illumina“, Olandija);
7. Termostatas – „CO2CELL“ („MMM group“, Vokietija);
8. Linijinis greitintuvas „Varian 6MV Clinac 600 C/D X-ray“ („Varian Medical Systems“, JAV);

2.1.4. Kitos priemonės

1. 6-, 24- ir 96-šulinėlių lėkštelės plokščiu dugnu („TPP“, Šveicarija);
2. U formos 96-šulinėlių lėkštelės („TPP“, Šveicarija);
3. 1,5 mL, 15mL ir 50 mL mėgintuvėliai („Eppendorf“, Vokietija);
4. Ląstelių skaičiavimo kameros
5. Serologinės pipetės ir antgaliai („TPP“, Šveicarija);
6. Pipetmanai („Eppendorf“, Vokietija).

2.1.5. Mitybinės terpės

1. DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle mitybinė terpė („ThermoFisher Scientific“, JAV);
2. RPMI 1640 – Roswell Park Memorial instituto terpė („ThermoFisher Scientific“, JAV);
3. DMEM/F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 terpė („ThermoFisher Scientific“, JAV).

2.1.6. Ląstelių kultūros

1. **DLD1** – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos Duke C tipo ląstelių linija (ATCC® numeris CCCL-221™). Ląstelės auginamos RPMI 1640 terpėje su 10 % FBS, pridėjus 100 U/mL penicilino, 100 µg/mL streptomicino, 3,5 g/L gliukozės, 2 mM L-alanil-L-glutamino, 3,7 g/L NaHCO3.
2. **HT29** – žmogaus gaubtinės žarnos karcinomos ląstelių linija (ATCC® numeris HTB38™). Ląstelės auginamos DMEM terpėje su 10% FBS, pridėjus 100 U/mL penicilino, 100 µg/mL streptomicino, 3,5 g/L gliukozės, 2 mM L-alanil-L-glutamino, 3,7 g/L NaHCO3.
3. **iVKL-DLD1** – perprogramuota DLD1 ląstelių linija. Ląstelių linija išvęsta Nacionalinio vėžio instituto molekulinės onkologijos laboratorijoje naudojant Yamanakos transkripcijos veiksnius (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc). Ląstelės auginamos DMEM/F12 terpėje su serumo pakaitalu 20 %, GlutaMAX (1X), MEM-NEAA (1X), β-merkaptoetanoliu (50 µM), bFGF (10ng/ml) ir ROCK kinaziu inhibitoriumi (10 µM).

4. **DLD1/PARP12^{-}; DLD1/PARP13^{-}; DLD1/PARP14^{-}** – DLD1 linijos ląstelės turinčios išjungtą PARP12, PARP13 arba PARP14 geną. Ląstelės kultivuojamos RPMI 1640 terpėje, kaip ir prieš tai minėtos laukinio tipo DLD1 ląstelės. Ląstelių sublinijos išvęstos Nacionaliniame vėžio institute molekulinės onkologijos laboratorijoje.
5. **HT29/PARP12^{-}; HT29/PARP13^{-}; HT29/PARP14^{-} –** HT29 linijos ląstelės turinčios išjungtą PARP9, PARP12, PARP13 arba PARP14 geną. Ląstelės kultivuojamos DMEM terpėje, kaip ir prieš tai minėtos laukinio tipo HT29 ląstelės. Ląstelių sublinijos išvęstos Nacionaliniame vėžio institute molekulinės onkologijos laboratorijoje.

2.1.7. TL-PGR naudojami pradmenys

Santykiniai genų raiškos pokyčiai buvo vertinami naudojant 2 lentelėje pateiktus pradmenys:

2 lentelė. TL-PGR naudojami pradmenys

Genas	Pradmenys	
	Tiesioginis – 5'-3'	**Atvirkštinis – 3'-5'**
CYCS	CCCAAGAAGTACATCCCTGGAA	GGCAGTGGCCAATTATTACTCA
POLE3	GGCCCGAGGACCTAAACCT	ATGTGGCGTACAGCACGAAG
PRKDC	AGGACCTATAGCGTTGTGCC	GGGATCACTCAGGTAAGCCG
RAD51	CAACCCATTTCACGGTTAGAGC	TTCTTTGGCGCATAGGCAACA
RFC3	GTGGACAAGTATCGGCCCTG	TGATGGTCCGTACACTAACAGAT
RRM2	CACGGAGCCGAAAACTAAAGC	TCTGCCTTCTTATACATCTGCCA
TBP	CCACTCACAGACTCTCACAAC	CTGCGGTACAATCCCAGA

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Ląstelių kultivavimas

2.2.1.1. Ląstelių auginimas 2D sąlygomis

Laukinio tipo DLD1, HT29 bei DLD1 ir HT29 su išveiklintais PARP genais kultivuojamos 25 cm^2 flakonuose su 5 mL ląstelių auginimo terpės. Ląstelės persėjamos 3 kartus per savaitę (kai ląstelių monosluoksnis auginimo inde padengia 80 % ploto). Tam tikslui nusiurbiama auginimo terpė, ląstelės praplaunamos su 1 mL PBS tirpalu ir atkeliamos, užpilant 1 mL 0,25% tripsino - 0,02 mM EDTA tirpalo ir inkubuojant 5 min. 37 °C temperatūroje. Ląstelėms atkibus nuo flakono dugno, tripsinas neutralizuojamas užpilant 4 mL auginimo terpės su 10% FBS

ir suspenduojant. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min. 500 g jėga. Supernatantas nupilamas, ląstelių peletas suspenduojamas 1 mL auginimo terpės bei pasirinktas ląstelių suspensijos tūris išpilstomas į naujus 25 cm^2 flakonus ilgesniam ląstelių kultivavimui arba naudojamas tolimesniuose eksperimentuose. Ląstelės auginamos 37°C temperatūroje, 5 % CO_2 sąlygomis.

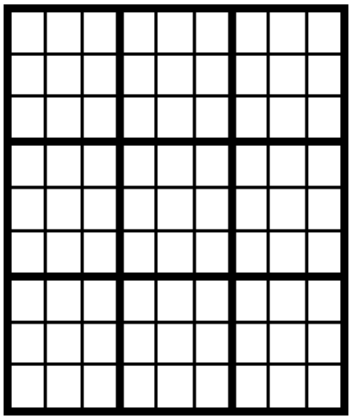
iVKL-DLD1 ląstelių kultūra auginama 6 šulinėlių lėkštelėse, modifikuotose su Geltrex®. Šiam tikslui 0,2 ml Geltrex® (konc. 12-18 mg/ml) atšildoma leduose ir sumaišoma su 19,2 ml DMEM/F12 terpės (naudojama darbinė koncentracija ~ 0,15 mg/ml). Į kiekvieną šulinėlį įpilama po 1,5 ml. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje 2 – 24 val., po to palaikomos iki poros valandų kambario temperatūroje, kad Geltrex® baigtų galutinai polimerizuotis ir naudojamos arba dedamos saugoti 4 °C temperatūroje, vėlesniam naudojimui. iVKL-DLD1 kolonijos yra persėjamos kas 3-5 dienas. Persėjimo metu nuo ląstelių nusiurbiama terpė. Ląstelės praplaunamos PBS ir veikiamos 0,25 mM EDTA tirpalu apie 1-2 min. kambario temperatūroje. Ląstelės švelniai atplaunamos su pilna DMEM/F12 augimo terpe ir naudojamos tolimesniuose eksperimentuose. Ląstelės auginamos 37° temperatūroje, 5 % CO_2 sąlygomis.

2.2.1.2. Ląstelių auginimas 3D sąlygomis – sferoidų formavimas

Laukinio tipo DLD1, HT29 bei DLD1 ir HT29 su išjungtais PARP genais auginami U formos 96 šulinėlių lėkštelėse. Tam į šulinėlį pilama 170 µl 1 % „low-melting“ agarozės tirpalo ir jis iškarto surenkamas. Procesas kartojamas, kol visi šulinėliai būna padengti. Lėkštelės inkubuojamas 4 °C temperatūroje, kol agarozė sustingsta.

2D sąlygomis augintos ląstelės atkeliamos su tripsino/EDTA tirpalu. Nuo ląstelių nusiurbiama terpė, ląstelės du kartus praplaunamos PBS tirpalu ir užlašinama 1 mL tripsino. Tripsinizacija vykdoma apie 5 min. 37 °C temperatūroje. Ląstelėms atkibus nuo flakono dugno, tripsinas neutralizuojamas užpilant 4 mL auginimo terpės su 10% FBS ir suspenduojant. Ląstelių suspensija centrifuguojama 5 min. 500 g jėga. Supernatantas nupilamas, ląstelių peletas suspenduojamas 1 mL auginimo terpės. Ląstelės skaičiuojamos hemocitometrinėje ląstelių skaičiavimo kameroje (4 pav.).

Reikiamas ląstelių skaičius (3 lentelė) sėjamas 96 šulinėlių lėkštelėje išpilstant po 100 µl terpės. Lėkštelės su ląstelėmis centrifuguojamos 15 min. 750 g jėga ir inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 % CO_2 sąlygomis. RNR skyrimui sferoidai auginami 7 dienas, ląstelių išgyvenamumo analizei – 14 dienų. Terpė keičiama kas antrą dieną. Tolimesniems tyrimams dalis sferoidų yra veikiama skirtingomis JS dozėmis.



4 pav. Hemocitometrinės 3x3 kameros padidintas vaizdas.

Ląstelių kiekis įvertinamas naudojantis (1) formule:

$$\text{Ląstelių kiekis/mL} = \frac{ląstelių\ kiekis}{3x3\ tinklelių\ skaičius} \times 10^4 \times skiedimas \qquad (1)$$

iVKL-DLD1 sferoidai auginami kaip ir prieš tai minėtos ląstelės, tik naudojama kita auginimo terpė ir į ją pridedama ROCK inhibitoriaus (iki galutinės 10 μM koncentracijos).

3 lentelė. Sferoidų formavimui naudojamų ląstelių skaičius norint 2 dieną užauginti vienodo – 400 μm skersmens (0,032 mm^3) sferoidus.

	Laukinio tipo	**PARP12$^-$**	**PARP13$^-$**	**PARP14$^-$**	**iVKL**
DLD1	4500 ląst.	4500 ląst.	5000 ląst.	3000 ląst.	1200 ląst.
HT29	2000 ląst.	1000 ląst.	2000 ląst.	1000 ląst.	-

2.2.1.3. Sferoidų dydžių įvertinimas

Sferoidų dydžiai vertinami šviesiniu „Eclipse TS100“ Nikon mikroskopu x4 objektyvu bei naudojantis mikroskopo programine įranga – „NIS-Elements F Ver4.30.01“. Sferoidų dydis fiksuojamas nuo 2 iki 14 auginimo dienos.

Sferoidų dydžių matavimui naudojamas „MATLAB“ programos papildinys „SpheroidSizer“ v.1.0 (Chen *et al*. 2014). Skaičiavimai atliekami naudojant 0,8325 μm/pix rezoliuciją, kiti parametrai nekeičiami.

2.2.1.4. Ląstelių auginimas 3D sąlygomis – auginimas tarpląsteliniame užpilde „GeltrexTM“

Laukinio tipo DLD1, HT29 bei DLD1 ir HT29 su išveiklintais PARP genais auginami 96 šulinėlių lėkštelėse su plokščiu dugnu modifikuotu agaroze. Tam į šulinėlį pilama 170 µL 1 % „low-melting“ agarozės tirpalo ir jis iškarto surenkamas. Procesas kartojamas, kol visi šulinėliai būna padengti. Lėkštelės inkubuojamas 4 °C temperatūroje, kol agarozė sustingsta. Su tripsino/EDTA tirpalu atkeltos ląstelės skaičiuojamos hemocitometrinėje ląstelių skaičiavimo kameroje. Į ląstelių suspensiją pridedama tarpląstelinio užpildo baltymų komplekso „Geltrex^{TM}“ iki galutinės 3,2 % koncentracijos. Į kiekvieną šulinėlį pilama 500 ląstelių spenduotų 100 µL terpės su tarpląstelinio užildo baltymų kompleksu. Ląstelės inkubuojamos 1 val. 37 °C temperatūroje, kol galutinai įvyksta „Geltrex^{TM}“ polimerizacija. Po valandos į kiekvieną šulinėlį pilama 100 µL terpės (be „Geltrex^{TM}“). Ląstelės 7 dienas auginamos 37 °C temperatūroje, 5 % CO_2 sąlygomis. Terpė keičiama kas antrą dieną. Tolimesniems tyrimams dalis ląstelių yra veikiama skirtingomis JS dozėmis.

2.2.2. Ląstelių švitinimas jonizuojančiąja spinduliuote

Paruoštos lėkštelės švitinamos Varian 600 CD linijiniu greitintuvu, 6 MV energijos rentgeno spinduliais, pasirinkta doze. Naudotos dozės: vienkartinė 2 Gy (toliau 1x2 Gy); vienkartinė 6 Gy (toliau 1x6 Gy); frakcionuota 2 Gy, kas 24 val. 5 dienas iš eilės (toliau 5x2 Gy). Ląstelės auginamos inkubatoriuje 37 °C temperatūroje, 5 % CO_2 sąlygomis iki tolimesnių eksperimentų.

2.2.3. Ląstelių gyvybingumo įvertinimas

2.2.3.1.Klonogeninė analizė

Ląstelių gebėjimo formuoti kolonijas įvertinimui į 6 šulinėlių lėkšteles užsėjamas reikiamas ląstelių skaičius (4 lentelė), kiekvienai JS dozei skiriant po 6 šulinėlius. Praėjus 24 val. plokštelės švitinamos pasirinkta JS doze (1x2 Gy; 1x6 Gy; 5x2 Gy). Lėkštelės dedamos į inkubatorių (37 ºC, 5% CO2), kur jos laikomos apie 2 savaites (kas 2 diena keičiant terpę), kol suformuoja pakankamai dideles kolonijas (mažiausiai iš 50 ląstelių). Joms susiformavus terpė nusiurbiama, šulinėliai 2 kartus praplaunami 1 mL PBS tirpalu. Kolonijos fiksuojamos į kiekvieną šulinėlį įpilant po 1 mL šalto 98% metanolio ir inkubuojant 10 min. kambario temperatūroje. Praėjus laikui, metanolis nusiurbiamas ir užfiksuotos kolonijos paliekamos džiūti. Į kiekvieną

šulinėlį įpilama po 1 ml 0,5% kristalinio violeto dažo tirpalo ir inkubuojama 20 min. Dažas nupilamas, kiekvienas šulinėlis praplaunamas vandeniu ir kolonijos paliekamos džiūti kambario temperatūroje.

4 lentelė. Klonogenineje analizėje naudojamas ląstelių kiekis. 3 šulinėliai užsėjami pirmu pateiktų ląstelių skaičiumi, sekantis 3 – dvigubai didesniu ląstelių skaičiumi. Naudojant aukštą (6 Gy) bei frakcionuotą (5x2 Gy) JS dozę sėjamas didesnis ląstelių skaičius.

	Kontrolė	**1x2 Gy**	**1x6 Gy**	**5x2 Gy**
Sėjamų ląstelių skaičius	250 ir 500	250 ir 500	500 ir 1000	500 ir 1000

Klonogeninėje analizėje skaičiuojamos nusidažusios kolonijos, kurias sudaro nemažiau kaip 50 ląstelių. Ląstelių išgyvenamumo rezultatai yra įvertinami pagal (2) ir (3) formules:

$$PE = \frac{Suformuotų\ kolonijų\ skaičius\ (kontrolė)}{Užsėtų\ ląstelių\ skaičius} \times 100\ \% \qquad (2)$$

PE – išsėjimo efektyvumas (angl. *plating efficiency*);

$$SF = \frac{Suformuotų\ kolonijų\ skaičius\ po\ poveikio\ JS}{Užsėtų\ ląstelių\ skaičius\ \times PE} \times 100\ \% \qquad (3)$$

SF – išgyvenusių ląstelių dalis (angl. *surviving fraction*). Laikoma, kad jonizuojančia spinduliuote neveiktų ląstelių (kontrolinių) SF yra lygus 100 %.

2.2.3.2. Ląstelių auginamų 3D struktūroje išgyvenamumo įvertinimas

Antrą dieną po užsėjimo ląstelės auginamos sferoidų pavidalu yra veikiamos skirtinga JS doze (1x2 Gy; 1x6 Gy; 5x2 Gy). Kas dieną, 14 dienų daromos sferoidų nuotraukos ir įvertinamas jų dydis. Išgyvenamumas apskaičuiojamas pagal (4) formulę:

$$SF = \frac{Jonizuojančiąja\ spinduliuote\ veiktų\ sferoidų\ skersmens\ vidurkis}{Kontrolinių\ sferoidų\ skersmens\ vidurkis} \times 100\ \% \qquad (4)$$

Ląstelės auginamos tarpląstelinio baltymų užpildo komplekse „Geltrex™“ pradedant nuo antros dienos yra švitinamos skirtinga JS doze (1x2 Gy; 1x6 Gy; 5x2 Gy). 7-ta auginimo diena skaičiuojamas suformuotų kolonijų skaičius. Išgyvenamumas įvertinamas pagal (2) ir (3) formules.

2.2.4. Genų raiškos pokyčių įvertinimas

2.2.4.1. RNR skyrimas

Visuminė RNR skiriama naudojantis „Quick-RNA™ MiniPrep“ (Zymo Research, JAV) rinkiniu bei vadovaujantis gamintojo rekomenduojamu protokolu. RNR skiriama 4 val. po paskutinio JS švitinimo iš ląstelių auginamų sferoidų pavidalu. Tam sferoidai surenkami į 1,5 mL „Eppendorf“ mėgintuvėlį. Mėgintuvėlis su sferoidais trumpai centrifuguojamas. Tuomet auginimo terpės likutis nusiurbiamas ir ląstelės suardomos 300 µL lizės buferinio tirpalo, kurio sudėtyje yra guanidino tiocianato – chaotropinės druskos, apsaugančios RNR nuo endogeninių RNazių. Ląstelių lizatas santykiu 1:1 sumaišomas 96% etanoliu ir gerai resuspenduojamas. Lizatas perkeliamas į „Zymo-spin^{TM} IIICG“ kolonėlę esančią surinkimo mėgintuvėlyje ir centrifuguojama 30 sek. 15000 g jėga. Chaotropinė druska ir etanolis lemia RNR prisijungimą prie silicio membranos gryninimo kolonėlėje, o tuo tarpu likęs lizatas centrifugavimo metu yra pašalinamas. Tuomet kolonėlė praplaunama plovimo buferiniais tirpalais, taip pašalinant prie kolonėlės membranos prikibusias priemaišas. Tam į kolonėlę įpilama 400 µL „RNA Prep“ vuferinio tirpalo ir centrifuguojama 30 sek. 15000 g jėga. Toliau į kolonėlę įpilama 700 µL „RNA Wash“ buferinio tirpalo ir centrifuguojama 30 sek. 15000 g jėga. Paskutinis žingsnis kartojamas tik naudojamas mažesnis kiekis „RNA Wash“ buferinio tirpalo (400 µL) ir centrifuguojama 2 min. 15000 g jėga. Galiausiai kolonėlė perkeliama į švarų „RNase-Free“ mėgintuvėlį ir gryna RNR yra eliuojama, panaudojant 30 µL mažos joninės jėgos vandenį be nukleazių, centrifuguojant 30 sek. 22000 g jėga.

RNR kiekis ir grynumas nustatomas spektrofotometriškai (Nanodrop 2000, ThermoScientific, JAV), matuojant sugertį ir nustatant $A_{260/280}$ ir $A_{260/230}$ santykius. RNR koncentracija apskaičiuojama pagal formulę (5):

$$C(\mu g/mL) = A_{260} \times 40 \quad (5)$$

C(µg/mL) – RNR koncentracija;

Išskirta RNR laikoma -70 °C temperatūroje.

2.2.4.2. Kopijinės DNR (kDNR) sintezė

kDNR sintezė atliekama 0,2 mL tūrio PGR mėgintuvėliuose naudojantis „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Scientific, JAV) rinkiniu pagal gamintojo protokolą. Į mėgintuvėlį pilama išskirtos RNR tirpalo (0,5 µg RNR), 1 µL atsitiktinių heksamerinių pradmenų tirpalo ir iki 12 µL pripilama vandens be nukleazių. Tuomet į kiekvieną mėgintuvėlį pilama po 8 µL reakcijos mišinio, kurį sudaro 4 µL 5X reakcijos buferinio tirpalo, 2 µL 10 mM dNTP mišinio,

1 µL ribonukleazių slopiklio tirpalo bei 1 µL 200 U/µL „RevertAid M-MuLV" atvirkštinės transkriptazės (5 lentelė). Supilstytas reakcijos mišinys švelniai sumaišomas ir trumpai centrifuguojamas. Visi reagentų tirpalai ir mišiniai iki pat reakcijos laikomi ledo vonelėje arba šaldomuose stoveliuose. Reakcija vykdoma termocikleryje „Labcycler" (SensoQuest GmbH, Vokietija) pagal programą: 5 min. 25 ºC; 60 min. 42 ºC; 5 min. 70 ºC. Susintetinta kDNR naudojama iš karto arba saugoma -20 ºC.

5 lentelė. Pirmosios grandinės kDNR sintezės mišinys vienai reakcijai (reagentai supilstomi paeiliui)

Reagentai	Tūris, µL	Galutinė koncentracija
RNR		25 ng/µL
Random Hexamer pradmenys	1	0,4 µ/M
dH_2O	Iki 12	2 mM
Reakcijos buferinis tirpalas	4	5x
RiboLock RNase inhibitorius	1	1 U
dNTP	2	0,2 mM kiekvieno
RevertAid M-MuLV RT	1	10 ng/µL
Bendras mišinio tūris	20	

2.2.4.3. Tikro laiko polimerazinė grandininė reakcija

Tikro laiko PGR (TL-PGR) reakcija atliekama naudojantis „KAPA SYBR FAST qPCR Kit" rinkiniu. Bendras vienos reakcijos tūris — 10 µL: 5 µL 2X reakcijos mišinio, į kurio sudėtį įeina KAPA SYBR FAST DNR polimerazė, dNTP, SYBR Green I interkaliuojantis dažas ir 2,5 mM $MgCl_2$; 0,2 µL 10 µM tiesioginio ir atvirkštinio pradmenų mišinio; 3,8 µL vandens be nukleazių; 1 µL 10 kartų skiesto kDNR tirpalo (6 lentelė). Reakcijos vykdomos 96 šulinėlių plokštelėse (Illumina, JAV) naudojant „Eco™ Real-Time PCR System" termociklerį, pagal programą pateiktą 7 lentelėje. Atliekami 3 kiekvieno geno techniniai pakartojimai kiekvienam biologiniam mėginiui. Atskaitos genas yra TBP (angl. *TATA-binding protein*). Ribinio slenksčio vertė 0,05. Duomenų analizei naudojama „EcoStudy Software" v5.0 programa.

6 lentelė. TL-PGR mišinys vienai reakcijai

Reagentai	Tūris, µL	Galutinė koncentracija
dH_2O	3,6	
2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	5	0,5x
Pradmenys (F+R)	0,4	0,4 µM
kDNR	1	2 ng/µL
Bendras mišinio tūris	10	

7 lentelė. TL-PGR reakcijos programa

Žingsnis	Laikas	Temperatūra, °C	Ciklų skaičius
Pradinė denatūracija	3 min.	95	1
Denatūracija	3 sek.	95	40
Pradmenų prijungimas/polimerizacija	30 sek.	60	
Lydymosi kreivės gavimas	15 sek.	95	40
	15 sek.	55	
	15 sek.	95	

Santykiniai genų raiškos pokyčiai apskaičiuojami $\Delta\Delta C_T$ metodu (Livak ir Schmittgen 2001) pagal (6) ir (7) formules:

$$n = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (6)$$

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T(taikinio\ vid.)} - C_{T(TBP\ vid.)})_{po\ poveikio\ JS} - (C_{T(taikinio\ vid.)} - C_{T(TBP\ vid.)})_{prieš\ poveikį\ JS} \quad (7)$$

n – genų raiškos pokytis (kartais);

$C_{T(taikinio\ vid.)}$ – tiriamojo mėginio ribinio ciklo vertė;

$C_{T(TBP\ vid.)}$ – kontrolinio mėginio (TBP) ribinio ciklo vertė.

2.2.5. Statistinė ir bioinformatinė duomenų analizė

2.2.5.1. Svertinė genų koekspresijos tinklo analizė

Koekspresiniai genų tinklai kurti R programoje („RStudio“) pagal 2005 metais aprašytus Zhang B. Ir Horvath S. protokolus (Zhang ir Horvath 2005). Buvo naudotas genų ekspresijos profilių panašumo matavimas, paremtas porinių Pearsono koreliacijos koeficientų matrica. Šis panašumas išreiškia atitikmenų matavimą tarp genų raiškos profilių, pasiskirsčiusių mėginiuose. Panašumų matrica transformuojama į gretimumo matricą, pasinaudojant jėgos gretimumo funckcija, kuri apibūdina ryšių tvirtumą tarp mazgų poros. Jėga β = 8 pasirinkta remiantis *scale-free* topologijos kriterijumi. Siekiant aptikti modulius, naudotas vidutinis jungčių hierarchinis grupavimas su skirtumų matavimu (Topologinio persiklojimo matavimas, angl. *Topological overlap measure* (TOM)). Šis matavimas atspindi persiklojimą tarp dviejų tiriamų taškų, o tuo pačiu ir tinklo vidinių sąryšių matavimą. Aptikti moduliai vaizduojami kaip dendrogramos šakos, kurios iškirptos naudojant dinaminį *Tree cut* algoritmą (Langfelder *et al*.

2008). R programoje naudoti rašmenys (angl. *scripts*) plačiau yra aprašyti Kalifornijos Los Andželo universiteto internetiniame puslapyje https://labs.genetics.ucla.edu (žiūrėta 2017-11-11). Kiekvieno modulio apibendrinimui ir vizualizavimui naudoti Cytoscape programos „ClueGO“ ir „GeneMania“ papildiniai.

2.2.5.2. Duomenų statistinė analizė

Duomenų statistinė analizė atlikta naudojant “GraphPad Prism 6” programa („GraphPad software“, JAV). Mikrogardelių duomenų variacijos korekcijai naudota *Lowess* normalizacija. Genų, kurių raiška kito reikšmingai, analizei naudotas *vienos imties t testas* bei *Benjamini-Hochberg* daugybinio palyginimo testas rezultatų tiklumui patvirtinti. Genai laikyti skirtingai reguliuojamais jei jų raiška tarp dviejų sąlygų kito daugiau kaip 1,5 karto (*p vertė* < 0,05).

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Radioterapija išlieka viena dažniausiai naudojamų vėžio gydymo metodų. Įprastai vėžiu sergantiems pacientams skiriama 2 ar 2,5 Gy JS dozė, iki gydymo pabaigos JS suminė dozė siekia 60-70 Gy. Tuo tarpu, kai ta pati JS dozė vienus pacientus išgydo pilnai, kituose – nėra gaunamas terapinis efektas Todėl svarbu yra nustatyti mechanizmus, signalinius kelius bei genus atsakingus už atsparumo radioterapijai įgavimą bei šios terapijos metodo efektyvinimą. Tam tikslui, šiame darbe, yra nagrinėjami mikrogardelių analizės metodu gauti visuminės genų raiškos duomenys. Taip pat tiriamas kolorektalinio vėžio ląstelių molekulinis atsakas po poveikio JS vienkartine (2 Gy ar 6 Gy) arba frakcionuota (3x2 Gy, 5x2 Gy) doze. Genai suskirstomi į genų grupes pagal biologinius procesus ir signalinius kelius bei tiriami daugiausiai tarpusavio saveikų turintys genai (Hub) (angl. *highly connected nodes*).

Žinoma, kad viena iš pagrindinių atsparumo JS poveikiui atsiradimo priežaščių yra vėžinės kamieninės ląstelės, todėl magistrinio darbo metu buvo auginamos iVKL-DLD1 ląstelės. Siekiant sukurti sistemą, artimesnę *in vivo* sąlygoms, pasitelktas erdvinių ląstelių kultūrų formavimo metodas (auginimas sferoidų pavidalu). Tokioje sistemoje auginamos ląstelės įgyja galimybę formuoti navikams būdingas heterogeniškas struktūras. Darbe lyginamas iVKL-DLD1 sferoidų atsakas į poveikį JS su atsaku laukinio tipo DLD1 sferoiduose.

Kadangi radioterapijos gydymo efektyvumas priklauso nuo DNR pažaidų taisymo greičio, todėl darbe toliau tiriami su viengrandinių bei dvigrandinių trūkių taisymu susiję PARP šeimos genai. Koekspresijos ir visuminės genų raiškos analizės rezultatai parodė, kad po poveikio JS padidėja PARP12, PARP13 ir PARP14 genų raiška, todėl toliau buvo tiriamas DLD1 ir HT29 ląstelių linijos turinčių išjungtą vieną iš šių genų išgyvenamumas po poveikio JS vienkartine (2 ir 6 Gy) ar frakcionuota (5x2 Gy) dozėmis.

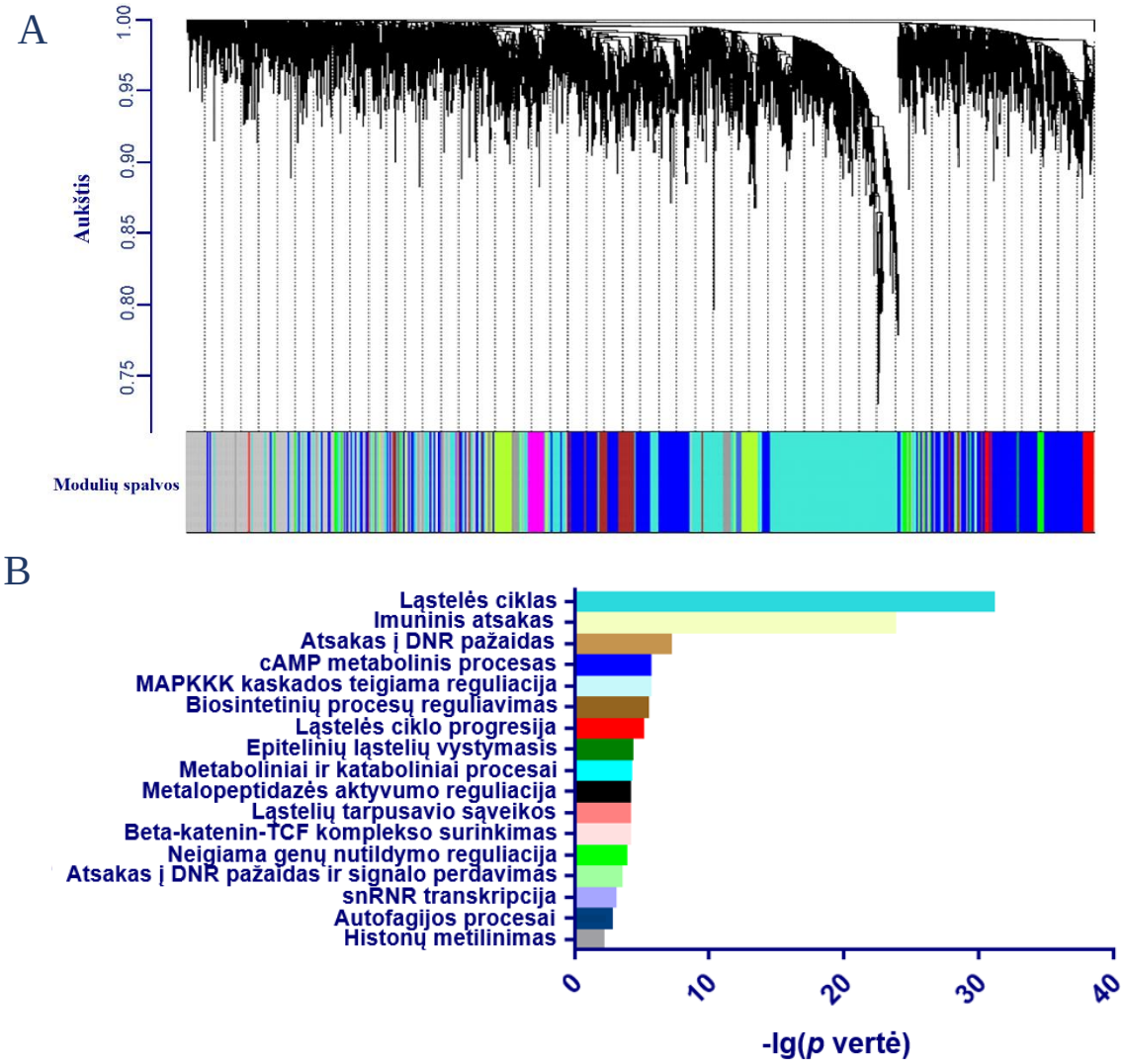
3.1. Genų koekspresinė analizė po poveikio jonizuojančiaja spinduliuote žarnyno vėžinėse ląstelėses

Siekiant nustatyti svarbiausius genus dalyvaujančius kolorektalinio vėžio ląstelių atsake į JS poveikį buvo atliekama svertinė genų koekspresijos tinklo analizė (WGCNA). Centrinė koekpresuojamų genų hipotezė teigia, kad šie genai: 1) yra ko-reguliuojami; 2) funkciškai susiję; 3) dalyvauja tose pačiose signaliniuose keliuose (Langfelder ir Horvath 2008).

WGCNA pagalba buvo sukonstruotas genų koekspresijos tinklas ir analizuojami ryšiai tarp genų, kurių raiška kito 6-iose kolorektalinio vėžio ląstelių linijose (DLD-1, HCT116, HT29, RKO, SW48 ir SW1463) paveiktose jonizuojančios spinduliuotės vienkartine arba

frakcionuota dozėmis (2 Gy, 4 Gy, 10 Gy, 12 Gy ir 5x2 Gy) (1 priedas). Viso genomo raiškos pokyčių mikrogardelių duomenys imami iš GEO (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (žiūrėta 2018-05-05)) duomenų bazės. Analizei panaudoti 31-os mikrogardelės duomenys po poveikio JS kolorektalinio vėžio ląstelėse, iš jų 24-ios buvo gautos mūsų laboratorijoje.

Visose mikrogardelėse statistiškai patikimai (p reikšmė <0,05) kito bendrų 13471 genų raiška. Šie genai ir jų raiškos pokyčiai analizuoti R programos „WGCNA“ paketo pagalba. Naudojant Zhang B. ir Horvath S. aprašytą metodiką genai buvo sugrupuoti į modulius (5 pav. A).



5 pav. Koekspresuojamų genų moduliai ir jų genų ontologinio GO (angl. *Gene ontology*) praturtinimo analizė. (A) Visų genų klasterinė dendrograma, kur x ašyje yra moduliai identifikuojami skirtingomis spalvomis, o y ašyje yra atskirų duomenų grupių artumas. (B) Genų koekspresijos modulių GO terminų histograma, kur pateikiamas neigiamas patikimumo p vertės logaritmas „-lg(p vertė)“. Modulių spalvos dendrogramoje atitinka modulių spalvas B grafike.

Nustatyti 23 koekspresijos moduliai, sudaryti nuo 42-ų iki 1576-ių genų. Iš visų modulių 17-a statistiškai patikimai priskirti įvairiems biologiniams procesams, naudojant

Cytoscape programos „ClueGO“ papildinį. Nustatyti ląstelės ciklo, imuninio atsako, DNR pažaidų patikros taškų, cAMP metabolinių procesų, MAPKKK kaskados teigiamos reguliacijos, biosintetinių procesų reguliacijos, ląstelės ciklos progresijos, epitelinių ląstelių vystymosi, metabolinių ir katabolinių procesų, metalopeptidazių aktyvumo reguliavimo, pažaidų signalo perdavimo, snRNR transkripcijos, autofagijos bei histonų metilinimo moduliai (5 pav. B).

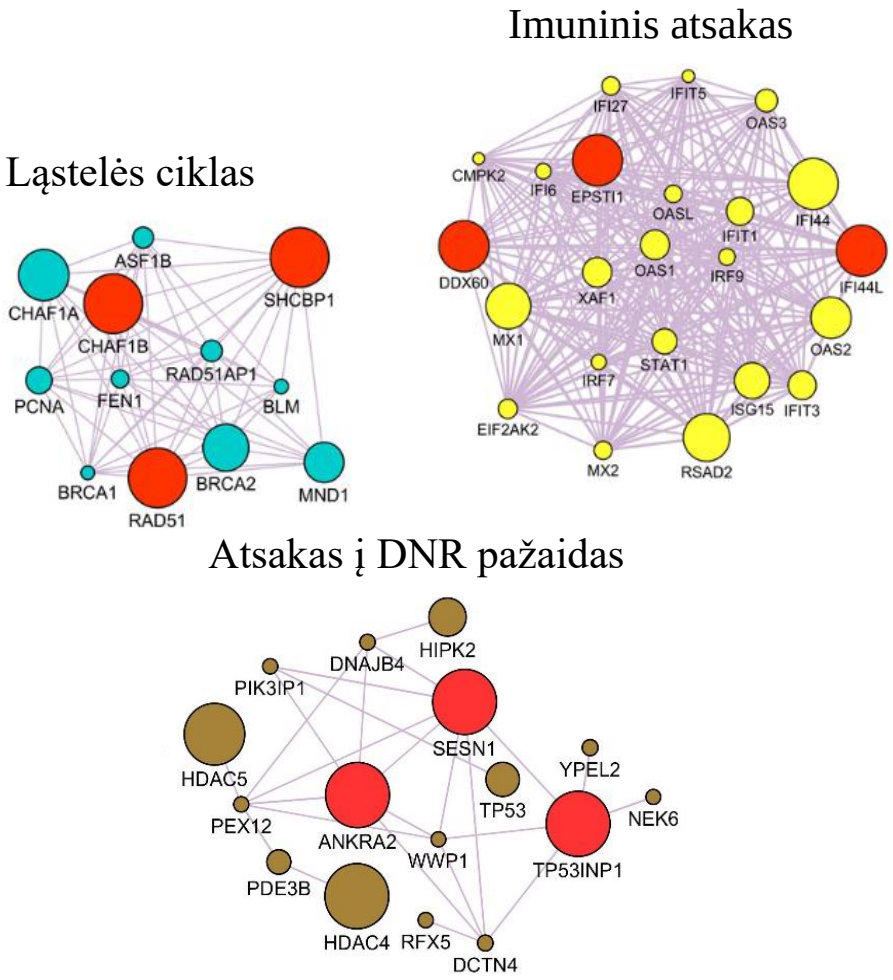
Pastebėta, kad patikimiausiems 3 moduliams buvo priskirtos ląstelės ciklo, imuninio atsako bei DNR pažaidų genų ontologiniai procesai. Kadangi šių modulių biologinės funkcijos yra tiesiogiai susijusios su atsaku į JS, tai juose esantys genai galėtų būti atsakingi už atsparumo radiacijai įgavimą.

WGCNA pagalba ląstelės ciklo, imuninio atsako ir DNR pažaidų moduliuose, remiantis tarpgeninių vidumodulinių jungčių (angl. *intra-modullar connectivity*) suma, nustatyti daugiausia sąveikų turintys Hub genai (6 pav.). Šių genų vizualizacijai panaudotas Cytoscape programos „GeneMania“ papildinys.

Ląstelės ciklo modulyje daugiausią sąveikų turintys genai yra CHAF1B (angl. *chromatin assembly factor 1 subunit B*), SHCBP1 (angl. *SHC binding and spindle associated 1*) ir RAD51. Pagrindinė CHAF1B funkcija yra histonų oktamerų prijungimas prie naujai replikuotos DNR molekulės, tačiau pastaruoju metu vis daugiau duomenų atsiranda apie šio baltymo sąsajas su DNR pažaidų taisymais bei atsparumo radiacijai įgavimu. Gevaert ir Plevris, atlikus koekspresinę analizę su glioblastomos ir kiaušidžių vėžio ląstelėse ekspresuojamais genais, iškėlė hipotezę, kad CHAF1B yra susijęs su ląstelių proliferacija bei DNR pažaidų taisymu. Be to, pastebėta, kad glioblastomos ląsteles paveikus JS vienkartine 8 Gy doze keičiasi CHAF1B raiška, todėl mokslininkai šiam genui priskiria prisitaikymo bei atsparumo JS funkcijas (Godoy *et al*. 2013; Gaevaert ir Plevris 2014). Šio geno raiškos mažėjimas stebimas 27-iuose iš 31-os mūsų tirtų mikrogardelių duomenyse.

RAD51 yra gerai žinomas genas dalyvaujantis dvigrandinių trūkių taisyme (plačiau 1.1.4. skyriuje). Pastebėta, kad RAD51 raiška, galimai, kontroliuojama tų pačių tranksripcijos veiksnių, kaip ir kamieniškumo geno – SOX2. Be to, atlikus glioblastomos vėžinių kamieninių ląstelių priverstinę diferenciaciją (angl. *forced differentiation*) sumažėja ne tik kamieniškumo genų raiška, bet kartu ir RAD51 (King *et al*. 2017). Tuo tarpu paveikus VKL skirtinga JS (1–8 Gy) doze RAD51 raiška padidėja. Balbous su kolegomis ištyrė, kad nuslopinus RAD51 tiek „paprastos“ vėžinės, tiek vėžinės kamieninės ląstelės tapo jautresnės JS poveikiui. Todėl yra manoma, kad šis genas yra vienas svarbiausių su atsparumo radioterapijai įgijimu susijusių genų (Godoy *et al*. 2013; Balbous *et al*. 2016). Iki šios dienos nėra atliktų sėkmingų klinikinių tyrimų su RAD51 slopikliais, tačiau RAD51 naudojamas kaip žymuo veliparib (PARP slopiklis) gydymo efektyvumui nustatyti

(NCT03044795). Iš 31-os šioje analizėje tirtų mikrogardelių 27-iose RAD51 geno raiška buvo padidėjusi.



6 pav. Ląstelės ciklo, imuninio atsako ir DNR pažaidų atsako modulių genų sąveikos tinklai. Raudonai pažymėti daugiausią sąveikų turintys genai. Melsva, geltona ir ruda spalvomis pažymėti „GeneMania“ papildinio pasiūlyti numatomi genas. Vizualizacija atlikta naudojant Cytotoscape programos „GeneMania“ papildinį.

SHCBP1 genas krūties bei kepenų vėžinėse ląstelėse aktyvina proliferacijos bei slopina apoptozės procesus. Proliferacijos reguliavime SHCBP1 dalyvauja kaip augimo veiksnių receptorių (insulino receptorius (IR); insulino augimo veiksnio receptorius (IGFR); epiderminio augimo veiksnio receptorius (EGFR); fibroblastų augimo veiksnio receptorius (FGFR)) aktyvatorius. Prieš-apoptotinės SHCBP1 savybės atsirandą dėl to, kad jis aktyvuoja MAPK/ERK ir PI3K/AKT/mTOR signalinius kelius bei didina ciklino D1 raišką. Tuo tarpu, SHCBP1 išveiklinimas sulėtina ląstelės ciklą bei slopina ląstelių proliferaciją (Tao *et al*. 2013; Feng *et al*. 2016). Tačiau apie SHCBP1 sąsajas su DNR pažaidų taisymu arba atsparumu radioterapijai įgijimu informacijos nėra. Kadangi SHCBP1 yra vienas iš ląstelės ciklo modulio hub genų

atsiradusių dėl JS poveikio, o jo raiška 26-iuose mėginiuose didėja, tai galima teigti, kad SHCBP1 yra atsakingas už vėžinių ląstelių prisitaikymą prie JS ir už atsparumo jos poveikiui didėjimą.

Imuninio atsako genų grupėje daugiausiai sąveikų turi EPSTI1 (angl. *epithelial stromal interaction*), DDX60 (angl. *DExD/H-box helicase 60*) ir IFI44L (angl. *interferon induced protein 44 like*) genai.

EPSTI1 baltymo funkcija yra siejama su vėžinių ląstelių migravimu, kamieniškumu bei apoptozės procesu. Apoptozės atveju, EPSTI1 slopinimas skatina proteazių Cas8, Cas7 ir Cas3 veiklą, kurie slopindami PARP1 aktyvumą (minėtos kaspazės skaldo PARP šeimos baltymus) ir stabdo viengrandinių DNR trūkių taisymą (Capdevila-Busquets *et al.* 2015). Analizuojamuose duomenyse EPSTI1 raiška didėjo (30-yje iš 31-os gardelės).

DDX60 genas yra aktyvinamas pirmojo tipo interferono pagalba, esant virusinei infekcijai, o padidėjusi raiška siejama su prasta terapine prognoze gerklų vėžio atveju (Fu *et al*. 2016). Tuo tarpu kolorektalinio vėžio ląstelėse po JS poveikio DDX60 raiška didėja (22-uose iš 31-os).

Informacijos apie imuninio atsako modulio trečią hub geną IFI44L yra nedaug. Žinoma, kad IFI44L raiška siejama su prastomis kasos vėžio gydymo prognozėmis, tačiau apie šio geno sąsajas su kitais vėžio tipais bei atsaku į JS poveikį ar DNR pažaidų taisymu atliktų tyrimų nėra. Po JS poveikio tik HT29 ląstelėse IFI44L geno raiška buvo padidėjusi, tuo tarpu kituose, tirtuose kolorektalinio vėžio ląstelėses šio geno raiškos pokytis nebuvo reikšmingas. Nors EPSTI1, DDX60 ir IFI44L tiesiogiai nėra susiję su atsaku į JS poveikį, tačiau jie yra koekpresuojami kartu su STAT1 (angl. *signal transducer and activator of transcription*) genu (6 pav.). STAT1 genas yra vienas pagrindinių IFN signalinio kelio genų ir manoma, kad dalyvauja radioatsparumo įgavime. Atsirandantis radioatsparumas aiškinamas, tuo, kad didėjant STAT1 geno raiškai, didėja interleukinų 6 ir 8 raiška, kurie slopina apoptozės procesus. (Efimova *et al*. 2009). Pastebėta, kad nutildant STAT1 geną, DDX60 ir IFI44L raiška irgi sparčiai sumažėja (Gaston *et al*. 2016), todėl galima manyti, kad šie genai galimai yra susiję su atsparumo radiacijai įgavimu.

SESN1 (angl. *sestrin 1*), TP53INP1 (angl. *tumor protein p53 inducible nuclear protein 1*) ir ANKRA2 (angl. *ankyrin repeat family A nember 2*) genai nustatyti kaip daugiausią sąveikų turintys genai DNR pažaidų modulyje. SESN1 yra antioksidacinėmis savybėmis pasižymintis, streso sąlygų aktyvinamas genas. Jis, kartu su SESN2 slopina mTOR signalinio kelio veiklą, taip slopinant ląstelių proliferaciją (Budanov ir Karin 2008). Įdomu, kad šio geno raiškos mažėjimas, taip pat, siejamas su ROS formų pagausėjimu ir mutacijomis (Kopnin *et al*. 2007). Kadangi SESN1 pasižymi ir naviką supresuojančiomis ir skatinančiomis savybėmis, tai jis nėra

nagrinėjamas kaip potencialus priešvėžinės terapijos taikinys. Iš 31-rių analizuojamų mikrogardelių duomenų, 24-iuose dėl JS poveikio SESN1 raiška didėjo.

TP53INP1 yra nuo p53 priklausomas vėžio supresorinis genas, kuris skatina nuo autofagijos priklausomą apoptozę. Kaip ir SESN1, TP53INP1 yra svarbus dėl JS poveikio atsiradusių ROS junginių šalinime. Esant išveiklintam p53 genui, TP53INP1 kartu su p73 sulėtina ląstelės ciklą ir reguliuoja ląstelių apoptozę. Gimdos kaklelio vėžinėse ląstelėse nuslopinus TP53INP1 raišką ir paveikus jas JS stipriai sulėtėja ląstelių augimas. Šio geno išjungimas apšvitintose HELA ląstelėse aktyvina apoptozės procesus, o fibroblastų ląstelėse po JS poveikio įvyksta mitotinė katastrofa arba stebimi ląstelių senėjimo procesai (Sandor *et al*. 2015). Mūsų analizės rezultatai rodo, kad TP53INP1 raiška, dėl JS poveikio kito panašiai kaip ir SESN1 atveju – visose ląstelių linijose raiška mažėjo išskyrus HT29 ir SW1463.

Tiksli ANKRA2 geno funkcija nėra aiški, tačiau yra pastebėta, kad jo raiška reguliuojama p53 geno bei po poveikio JS jo raiška didėja (Parikh *et al*. 2014). Panašus raiškos didėjimas pastebimas ir šiame skyriuje aprašomuose duomenyse. 28-niuose iš 31-rių mėginių ANKRA2 geno raiška didėjo. Kadangi ANKRA2 yra vienas iš DNR pažaidų taisymo modulio Hub genų, o dėl JS poveikio jo raiška didėja, tai galima kelti hipotezę, kad ANKRA2 yra susijęs DNR pažaidų taisymo procesais ir yra atsakingas už vėžinių ląstelių prisitaikymą prie JS ir už radioatsparumo didėjimą.

Žinant už radioatsparumą atsakingus genus ir turint jų koekspresijos tinklus, teoriškai galima nustatyti, kiek ir kokius genus reikia išjungti norint išveiklinti visą tinklą ir taip įjautrinti vėžines ląsteles.

3.2. Visuminės genų raiškos analizė jonizuojančiąja spinduliuote paveiktose DLD1 ir iVKL DLD1 ląstelėse augintose 3D modelinėje sistemoje

Viena iš pagrindinių priežasčių, kodėl radioterapijos poveikis ląstelėms ne visada pasiekia norimų rezultatų yra vėžinės kamieninės ląstelės. Todėl toliau buvo siekiama palyginti atsaką po JS tarp vėžinių (DLD1) ir vėžinių kamienių (iVKL-DLD1) ląstelių.

DLD1 ir laboratorijoje išvestos indukuotos vėžinės kamieninės DLD1 ląstelės buvo augintos 3D ląstelių kultūrų modelinėje sistemoje. Parodyta, kad tokiu būdu auginamos ląstelės įgyja galimybę formuoti *in vivo* navikams būdingas struktūras (Weiswald *et al*., 2015). Ląstelių sferoidai buvo veikti JS frakcionuotomis (3x2 Gy ar 5x2 Gy) dozėmis ir praėjus 4 val. po

paskutinio JS poveikio išskirta ląstelių visuminė RNR. Ji vėliau buvo naudojama genų raiškos pokyčių matavimams mikrogardelių ir TL-PGR metodais.

Atlikus pradinę analizę GeneSpringGX v1.0 programine įranga ir apdorojus duomenis gautus iš mikrogardelių eksperimento, buvo nustatyti skirtingai reugliuojami genai po poveikio JS. Rezultatų tikslumui patvirtinti taikytas vienos imties *t testą* bei *Benjamini-Hochberg* daugybinio palyginimo testas. Genų raiškos pokytis analizuotas kaip patikimas, jei jis kito virš 1,5 karto bei jo statistinė *p* vertė buvo mažesnė nei 0,05.

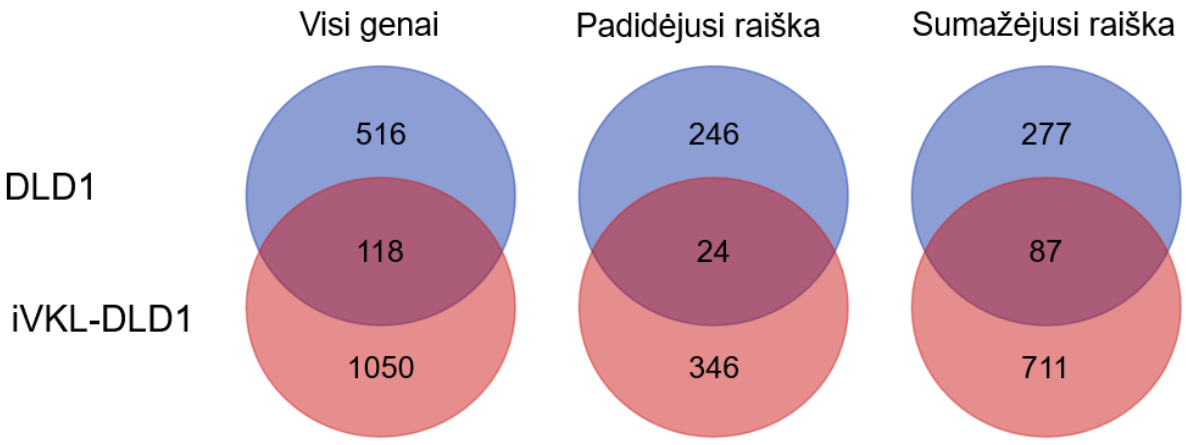
Duomenys gauti iš mikrogardelių eksperimento rodo, kad 7 dienas 3D pavidalu augintose vėžinėse DLD1 ląstelėse po poveikio frakcionuota JS kito 634-ių genų raiška. Iš kurių 270 pasižymėjo padidėjusia raiška, o 364 – sumažėjusia. Tuo tarpu, 3D pavidalu augintose iVKL-DLD1 ląstelėse po poveikio JS pakito 1168-ių genų raiška, iš kurių 370 didėjo, o 798 mažėjo (8 lentelė). Tai parodo, kad iVKL-DLD1 didesnės dalies genų raiška dėl JS poveikio yra slopinama.

8 lentelė. Skirtingai reguliuojamų genų skaičius DLD1 ir iVKL DLD1 ląstelėse po poveikio frakcionuota JS. Analizuotų genų raiškos pokytis > 1,5 karto, o *p* vertė < 0,05.

Ląstelių linija	JS poveikis	Visų patikimai pakitusių genų skaičius	Padidėjusią raišką turintys genai	Sumažėjusią raišką turintys genai
DLD1	5x2 Gy	634	270	364
iVKL-DLD1	3x2 Gy	1168	370	798

Iš atliktos analizės galima pastebėti, kad iVKL-DLD1 atsakas į JS yra labiau praturtintas ir skiriasi nuo DLD1 ląstelių.

Toliau, buvo lyginami genų raiškos pokyčiai po JS laukinio tipo DLD1 vėžinėse ląstelėse su iVKL-DLD1 (7 pav.).



7 pav. Veno diagrama vaizduojanti skirtingai reguliuojamųjų genų pasiskirstymą frakcionuota JS doze veiktose laukinio tipo DLD1 ir iVKL DLD1 ląstelėse. Vizualizacija atlikta naudojant http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn (žiūrėta 2018-05-01) įrankį.

Nustatyta, kad dėl frakcionuotos JS poveikio abiejose ląstelių linijose bendrai kito 118 genų raiška. Tuo tarpu, laukinio tipo ląstelėse buvo 516, o iVKL – 1050 unikaliai kintančių genų. Žiūrint į padidėjusią raišką turinčius genus, iš 270-ies genų būdingų DLD1 po poveikio 3x2 Gy JS doze 246 yra unikalūs, o iVKL-DLD1 po poveikio 5x2 Gy JS doze iš 370-ies genų 346 yra unikalūs. Bendrų genų skaičius, kurių raiška didėjo abiejose ląstelių sublinijose yra 24. Tuo tarpu dėl JS poveikio DLD1 ląstelėse mažėjo 277 ūnikalių genų raišką, o iVKL-DLD1 – 711-os. Bendrų sumažėjusią raišką turinčių genų yra 87.

Tam, kad atsakyti į klausimą kaip skiriasi atsakas į JS tarp dviejų tiriamų ląstelių linijų toliau buvo tikrinta kokiuose signaliniuose keliuose dalyvauja nustatyti genai.

Pasitelkus genų anotacijos įrankiu WebGestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) ir KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) duombazę nustatyta, kad DLD1 ląstelėse 634 patikimai pakitę genai dalyvauja 41-ame skirtingai reguliuojamame signaliniame kelyje. Šiame darbe analizei buvo pasirinkti signaliniai keliai, kurie gali turėti tiesioginį poveikį procesams vykstantiems dėl JS poveikio, t.y. keliai susiję su ląstelės ciklo reguliavimų ir DNR pažaidų taisymais. Iš 41-o signalinio kelio, kuriuose dalyvauja DLD1 ląstelės po poveikio JS, 8 priskiriami kaip su ląstelės ciklu ir DNR pažaidomis susiję signaliniai keliai. Tuo tarpu, iVKL-DLD1 ląstelėse 1168 patikimai pakitę genai dalyvauja 87-iuose skirtingai reguliuojamuose signaliniuose keliuose. Pastebėta, kad abiejose ląstelių sublinijose po JS poveikio dalyvaujantys genai atsakingi už bazių iškirpimo reparacijos (BER), DNR replikacijos (DNA replication), homologinės rekombinacijos (HR), nukleotidų iškirpimo reparacijos (NBER), ląstelės ciklo (cell cycle), nehomologinių galų sujungimo (NHEJ), nekomplementarių nukleotidų reparacijos (angl. *mismatch repair*) ir p53 signalinį kelią (9 lentelė). Po poveikio JS DLD1 ląstelėse pagal praturtinimą KEGG kategorijoje aukščiausią *p* vertę turi DNR replikacijos ir ląstelės ciklo signaliniai keliai (abiejų *p* vertė lygi $3{,}48 \times 10^{-9}$). Šie signaliniai keliai yra labiausiai praturtinti galimai dėl to, kad po poveikio JS įvyksta DNR viengrandiniai ir/arba dvigrandiniai trūkiai ir sulėtinamas ar net sustabdomas ląstelių ciklas. Esant G0/G1 fazei DNR trūkiai taisomi nehomologinių galų sujungimo signalinio kelio pagalba, o esant S-G2/M fazei aktyvinamas homologinių rekombinacijų signalinis kelias (Blanpain *et al.* 2011).

Tuo tarpu iVKL-DLD1 ląstelėse aukščiausia *p* vertę turi bazių iškirpimo reparacijos signalinis kelias ($5{,}20 \times 10^{-6}$). BER kelias įjungiamas esant viengrandžiams trūkiams, kuriuos dažniausiai sukelia ROS junginiai (Abbotts ir Wilson 2017). Įdomu tai, kad iVKL-DLD1 po radioterapijos mažėja BER signalinio kelio OGG1 geno raiška (1,77 karto). Pastebėta, kad padidėjusi šio geno raiška kolorektalinio vėžio DLD1 ląstelėse siejama su radioatsparumu, o šio genų slopinimas ar išveiklinimas padidina ląstelių jautrumą JS poveikiui. Tuo tarpu limfomos TK6

ląstelėse pastebimas priešingas OGG1 poveikis. Esant padidėjusiai šio geno raiškai ląstelės yra labiau jautrios JS poveikiui. Toks skirtingas OGG1 veikimas paaiškinamas tuo, kad kai kurios ląstelės, stiprinant BER aktyvumą, prisitaiko prie aukštų ROS junginių koncentracijų, taip įgijant atsparumą radioterapijai (Ramdzan *et al*. 2017).

Nors po poveikio JS DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse įjungiami panašūs signaliniai keliai, tačiau juose dalyvaujantys genai retai sutampa. Už ląstelės ciklo ir DNR pažaidas atsakinguose signaliniuose keliuose bendri yra RFC3, MCM5, RAD51, PRKDC, RRM2, SHISA5 ir CYCS genai.

9 lentelė. Signaliniai keliai, bei juose dalyvaujantys genai, praturtinti DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse po poveikio frakcionuota JS. Prie genų esančios strelytės parodo genų raiškos pokytį. ↑ - raiška didėjo; ↓ - raiška mažėjo. Analizė atlikta naudojant „WebGestalt“ anotacijos įrankį.

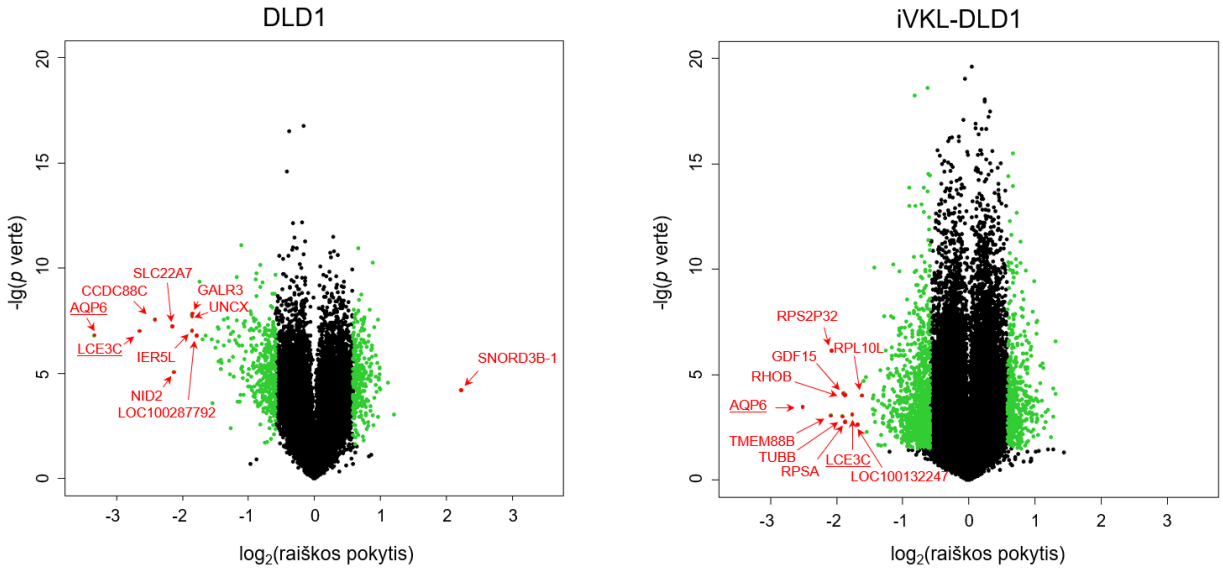
KEGG signalinis kelias	DLD1			iVKL DLD1			Bendri genai
	Genų #	Genai	*p* vertė	Genų #	Genai	*p* vertė	
Bazių iškirpymo reparacija	5	HMGB1↑; PCNA↑; NTHL1↓; POLD2↑; POLL↓	0,0008	9	PARP1↑; POLE2↑; APEX1↑; APEX2↓; POLE3↓; POLD3↓; OGG1↓; MUTYH↓; POLE4↑	5,20e-06	-
DNR replikacija	10	RPA2↑; POLA2↑; RFC3↑; MCM6↑; PCNA↑; MCM5↑; MCM2↑; RFC2↑; MCM3↑; POLD2↑	3,48e-09	9	RFC3↓; POLE2↑; MCM5↑; RNASEH2A↓; POLE3↓; RNASEH2B↓; POLD3↓; POLE4↑; PRIM1↓	9,47e-06	RFC3; MCM5
Homologines rekombinacijos	5	RPA2↑; RAD51C↑; RAD54L↑; RAD51↑; POLD2↑	0,0005	6	RAD52↓; BLM↓; POLD3↓; RAD51↑; RAD50↓; RAD54B↓	0,0007	RAD51
Nukleotidų iškirpymo reparacija	5	RPA2↑; RFC3↑; PCNA↑; RFC2↑; POLD2↑	0,0026	6	POLE3↓; RFC3↓; POLE2↑; POLD3; CUL4B↓; POLE4↑	0,0037	RFC3
Ląstelės ciklas	16	MCM6↑; PRKDC↑; BUB1B↑; CHEK1↑; PKMYT1↑; CDKN1A↑; MCM2↑; CDK1↑; PCNA↑; MCM5↑; CCND3↑; E2F1↑; BUB1↑; E2F2↑; ORC6↑; MCM3↑ ;	3,48e-09	12	CCNE2↓; CDKN2C↓; ANAPC1↓; BUB3↑; PRKDC↑; MYC↓; MCM5↑; CDC20↑; E2F5↓; CUL1↓; YWHAZ↑; HDAC2↓	0,0007	PRKDC; MCM5
p53 signalinis kelias	11	PMAIP1↑; CCND3↑; RRM2↑; BBC3↓; SHISA5↓; CYCS↑; CHEK1↑; CDKN1A↑; CDK1↑; FAS↑; THBS1↑	1,31e-07	8	CCNE2↓; EI24↓; GTSE1↓; RRM2↑; SHISA5↓; CYCS↑; STEAP3; CCNG1↓	0,0020	RRM2; SHISA5; CYCS
Nehomologinis galų sujungimas	2	PRKDC↑; POLL↓	0,0422	3	PRKDC↑; RAD50↓; POLM↓	0,0123	PRKDC
Nekomplementarių nukleotidų reparacijos	6	RPA2↑; EXO1↑; RFC3↑; PCNA↑; RFC2↑; POLD2↑	1,33e-05	3	RFC3↓; POLD3↓; MSH2↓	0,0420	RFC3

Analizuojant genų dalyvaujančių ląstelių atsakę į JS poveikį reguliaciją, pastebėta, kad DLD1 ląstelėse dėl jonizuojančios spinduliuotės su DNR pažaidomis susijusiuose signaliniuose keliuose dalyvaujančių genų raiška yra padidėjusi (64 iš 68-ių). Tuo tarpu iVKL-DLD1 ląstelėse 36-ių iš 54-ių genų raiška mažėja. Taigi, nors KEGG signaliniai keliai abiejose ląstelių linijose yra tie patys, tačiau genų reguliacija juose skirtinga. Todėl vienas iš galimų būdų kaip iVKL-DLD1 ląstelės įgauna atsparumą JS poveikiui yra DNR taisymo mechanizmuose dalyvaujančių genų slopinimas.

Žvelgiant į genus, kurių raiška labiausiai kito dėl frakcionuotos JS poveikio, pastebėta, kad DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse labiausiai kintantis genas yra AQP6 (angl. *aquaporin* 6) (8 pav.). Po poveikio 5x2 Gy JS DLD1 ląstelėse šio geno raiška mažėjo ~10,14 kartų (p = 0,018), tuo tarpu iVKL-DLD1 ląstelėse po poveikio 3x2 Gy JS – mažėjo ~5,7 kartų (p = 0,009). Akvaporinai tai membraninių baltymų šeima, reguliuojanti selektyvų vandens ir kitų jonų transportą per membraną susidarant osmotinio slėgio gradientui. Vėžio atveju, akvaporinai palengvina vandens patekimą į naviko vietą, taip sukeliant edemą (skysčio susikaupimą audiniuose) ir vėžio išplitimą. Manoma, kad šios šeimos baltymai taip pat yra atsakingi už proliferacijos, angiogenezės ir migracijos procesus. Patebėta, kad AQP1 raiškos padidėjimas svarbus lamelipodijų formavime. Akvaporinai taip pat yra atsakingi už ląstelių tūrio pokyčius, kurie sąlygoja ląstelių judėjimą (Khajah ir Luqmani 2016). Apie AQP6 sąsajas su naviko vystymusi ar atsaku į JS poveikį informacijos nėra daug, tačiau žinoma, kad po chemoterapinio poveikio, kiaušidžių vėžio atveju, AQP6 raiškos padidėjimas siejamas su gera ligos prognoze (Chetry *et al*. 2018). Kadangi abiejose tirtose ląstelių sublinijose AQP6 raiška dėl JS poveikio stipriai mažėjo, tai galima manyti šis genas yra svarbus vėžinių ląstelių atsake į radiacijos poveikį.

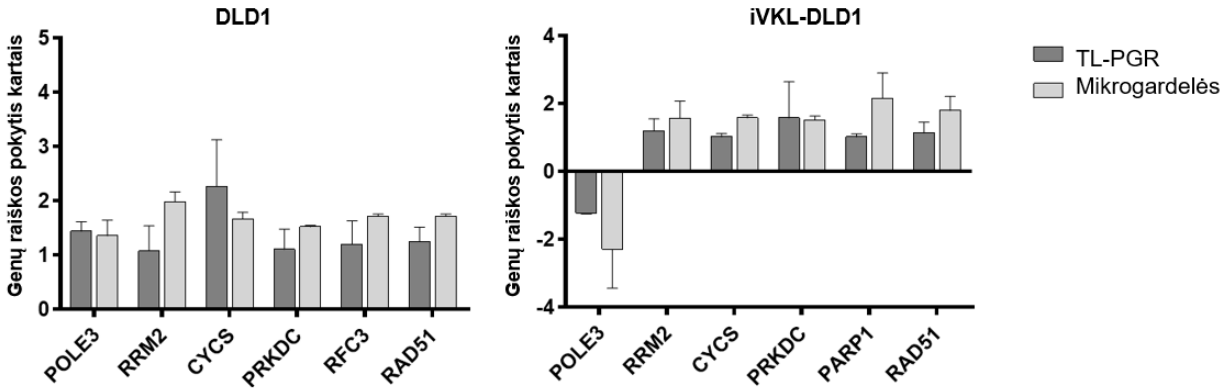
Dėl JS poveikio DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse taip pat reikšmingai keitėsi LCE3C (angl. *late cornified envelope 3C*) geno raiška. Po poveikio 5x2 Gy JS DLD1 ląstelėse šio geno raiška mažėjo ~6,28 kartų (p = 0,024), tuo tarpu iVKL-DLD1 ląstelėse po poveikio 3x2 Gy JS – mažėjo ~3,39 kartų (p = 0,013). LCE3C priklauso epidermio diferenciacijos kompleksui (angl. *epidermal differentiation complex* (EDC)). Šio komplekso baltymai yra svarbūs epidermio ląstelių diferenciacijoje bei ROS junginių šalinime. EDC baltymai turi daug amino rūgšties cisteino, kas leidžia jiems tiesiogiai sąveikauti su ROS junginiais, formuojant disulfidinius tiltelius (Schafer ir Werner, 2011). Išanalizavus mikrogardelių duomenis (žiūreti 3.1 skyrių), pastebėta, kad iš 31 analizuotos mikrogardelės duomenų, 26 LCE3C raiška mažėjo daugiau nei 2 kartus ($p < 0,05$). Be to, pastebėta, kad kitų šios grupės genų raiška po poveikio JS irgi reikšmingai mažėjo. Daugiau nei 1,5 karto mažėjo LCE1A, LCE1C ir LCE1D (24-iuose iš 31-os mikrogardelės) genų raiška, o LCE3A – mažėjo virš 3 kartų (26-iuose mikrogardelėse). Kadangi po JS poveikio didėja ROS

junginių kiekis, o LCE3C galimai atsakingas už jų šalinimą, tai galima manyti, kad šis genas yra svarbus ląstelių atsake į radioterapijos poveikį, o dar didesnis šio geno slopinimas galėtų padidinti ROS junginių koncentraciją – sumažinti ląstelių išgyvenamumą.



8 pav. Ugnikalnio grafikas (angl. *volcano plot*) vaizduojantis genų raiškos pokyčius po poveikio JS DLD1 ir iVKL-DLD1 ląstelėse, kur x ašyje yra dvejatainis raiškos pokyčio logaritmas „$\log_2$(raiškos pokytis)“, o y – neigiamas dešimtainis patikimumo *p* vertės logaritmas „-lg(*p* vertė)“. Genai, kurių raiškos pokytis > 1,5 karto, o $p < 0,05$ pavaizduoti žalia spalva, o 10 didžiausią raiškos pokytį turintys genai pavaizduoti raudona spalva. Bendri labiausiai kintantys genai abiejose ląstelių sublinijose yra pabraukti (AQP6 ir LCE3C).

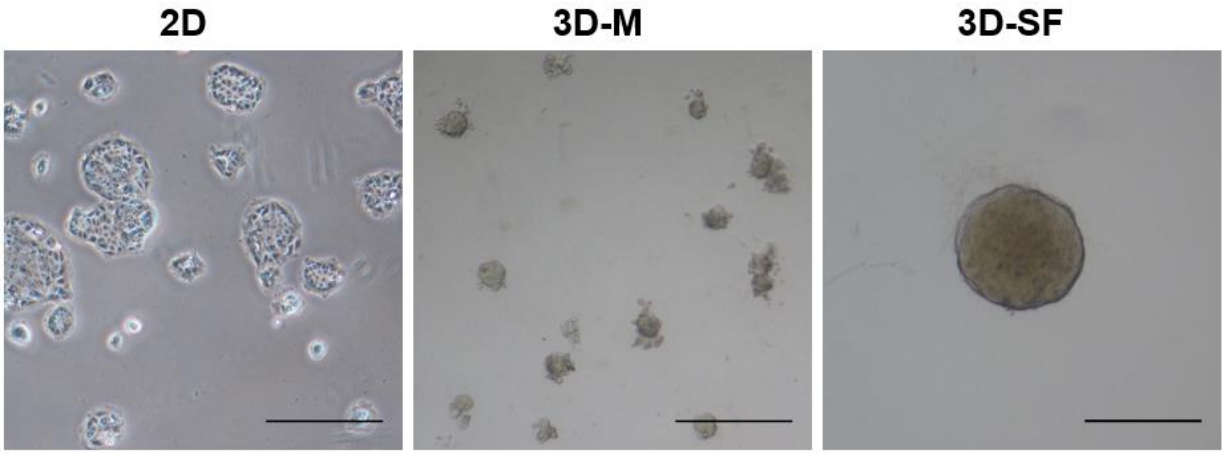
Siekiant validuoti visuminę genų raiškos analizę mikrogardelių metodu, buvo atliktas genų raiškos palyginimas tikro laiko PGR (TL-PGR). Patikrinti POLE3, RRM2, CYCS, PRKDC, RFC3, PARP1 ir RAD51 genų raiškos pokyčiai (9 pav.).



9 pav. Mikrogardelių tyrimo duomenų validacija TL-PGR metodo pagalba. TBP (angl. *tata binding* protein) naudotas kaip atskaitos genas. Taikytas ribinis slenkstis 0,05.

3.3. PARP šeimos genų įtaką ląstelių išgyvenamumui po poveikio JS

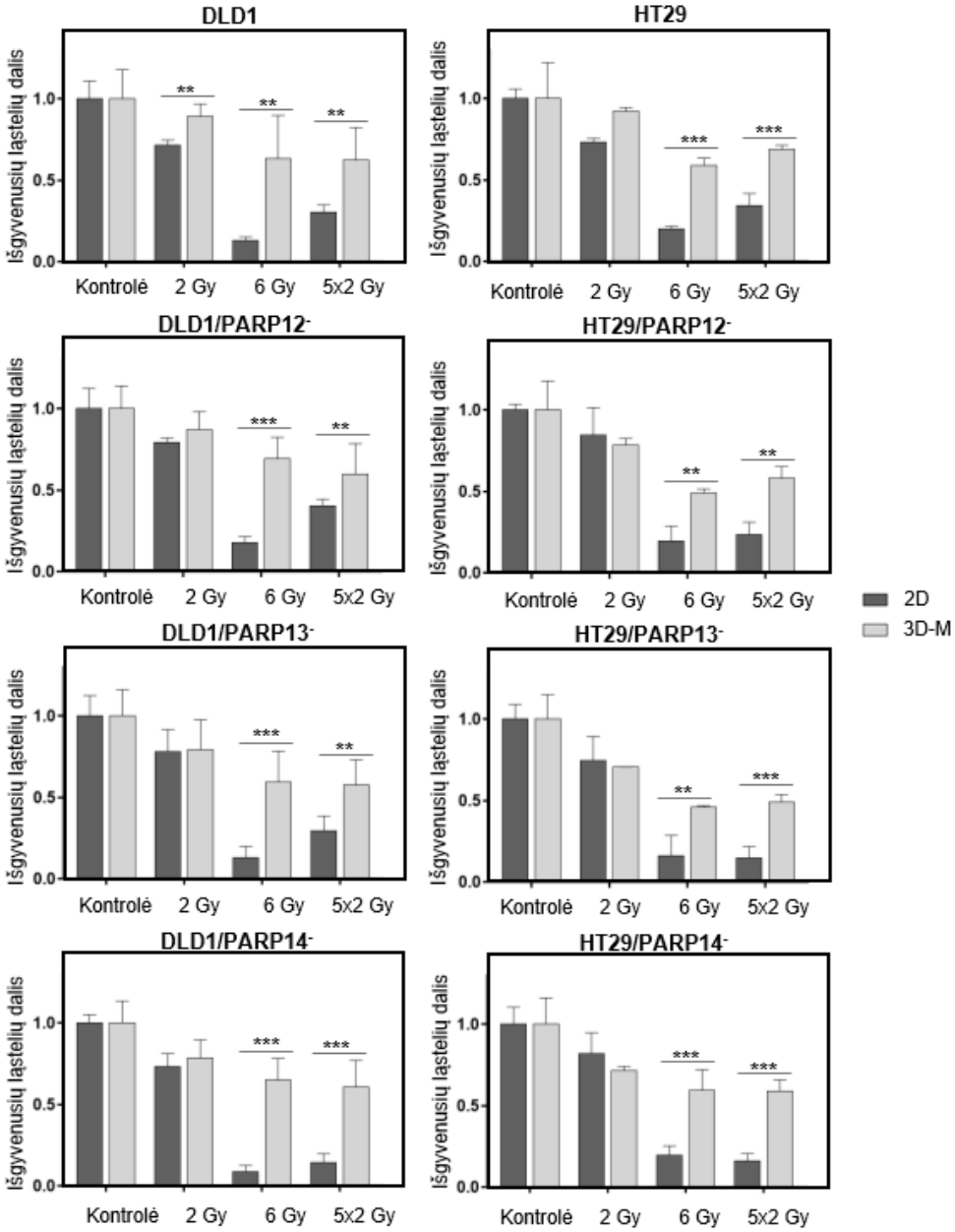
PARP šeimos baltymai dalyvauja DNR pažaidų taisyme. Šiuo metu gydymui bei ikiklinikiniuose ir klinikiniuose tyrimuose jau naudojami PARP1 ir PARP2 slopikliai, tačiau apie kitų PARP šeimos genų raiškos slopinimą informacijos yra nedaug. Koekpresinėje analizėje pastebėta, kad po poveikio JS, daugelyje kolorektalinio vėžio ląstelių patikimai kito PARP2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16 genų raiška. Kadangi PARP12 ir PARP14 genų raiška po JS poveikio didėjo (atitinkamai 27-iuose ir 29-iuose iš 31-os mikrogardelėse), tai tolimesnė analizė buvo atliekama su šiais genais. Genas PARP13 taip pat buvo įtrauktas į analizę, kadangi mūsų laboratorijoje atlikti tyrimai parodė, jog HT29 ląstelėse po JS poveikio šio geno raiška igi reikšmingai didėjo. Dėl šios priežasties mūsų laboratorijoje buvo nuspręsta išvęsti DLD1 ir HT29 ląstelių linijas su išveiklintais PARP12, PARP13 ar PARP14 genais. Šių genų išveiklinimui buvo naudojama CRIPSR/Cas9 sistema. Dėl šios priežasties šiame darbe buvo tiriamas išvestų sublinijų išgyvenamumas po poveikio JS vienkartinėmis (1x2 Gy bei 1x6 Gy) bei frakcionuotomis (5x2 Gy) dozėmis. Tam tikslui ląstelės buvo auginamos trijose skirtingose ląstelių kultūrų sistemose: 2D – auginant ant plastiko paviršiaus; 3D-M – auginant ląsteles tarpląstelinio užpildo baltymų kultūroje; 3D-SF – auginant ląsteles kaip 3D ląstelių agregatus (sferoidus) (10 pav.).



10 pav. Ląstelių morfologija auginant skirtingose modelinėse sistemose. Nuotraukose pavaizduotos laukinio tipo DLD1 ląstelės. 2D – auginimas ant plastiko paviršiaus; 3D-M – auginimas tarpląstelinio užpildo baltymų kultūroje; 3D-SF – auginimas sferoidų pavidalu. Mąstelis atitinka 500 μm.

Pastebėta, kad vėžinių ląstelių atsparumas genotoksinių agentų poveikiui priklauso ne tik nuo pačių ląstelių savybių, bet ir jų mikroaplinkos. Žinoma, kad ląstelių auginimas *in vivo* aplinką primenančiomis sąlygomis, t.y. 3D ląstelių kultūroje, lemia skirtingą proliferaciją, diferenciaciją ir išgyvenamumą lyginant su 2D modeline sistema (Stankevicius *et al*. 2017). Dėl šios priežasties, pirmiausia buvo lyginamas ląstelių išgyvenamumas po JS poveikio vienkartinėmis ir frakcionuotomis dozėmis 2D ir 3D-M modelinėse sistemose (11 pav.) (2 priedas).

Apšvitinus ląsteles JS vienkartine 2 Gy doze tiek 2D, tiek 3D ląstelių kultūroje išgyvenamumas mažėjo nežymiai. Tuo tarpu švitinant ląsteles 6 Gy ar 5x2 Gy JS doze, pastebimas žymus ląstelių gyvybingumo sumažėjimas nepriklausomai nuo auginimo sąlygų. Po JS poveikio 6 Gy ar 5x2 Gy doze DLD1 ląstelių linijoje 2D sistemoje mažiausiai išgyveno ląstelės turinčios išveiklintą PARP14 geną (atitinkamai ~ 0,08 ir ~ 0,14). Tuo tarpu PARP12 ir PARP13 genų išveiklinimas neturėjo reikšmingo poveikio išgyvenamumui 2D modelinėje sistemoje (laukinio tipo DLD1 – 0,13 ir 0,3; DLD1/PARP12$^-$ – 0,18 ir 0,4, DLD1/PARP13$^-$ – 0,13 ir 0,29 atitinkamai po 6 Gy ir 5x2 Gy JS poveikio).



11 pav. PARP genų išveiklinimo įtaka ląstelių gyvybingumui po poveikio JS 2D ir 3D-GT modelinėse sistemose. Kontrolė – nešvitintos ląstelės. Žvaigždutės (*) parodo skirtumo patikimumą, kur (*) atitinka *p* verte < 0,05; (**) atitinka *p* verte < 0,01; (***) atitinka *p* verte < 0,001. Patikimumui įvertinti buvo naudotas *t testas*.

Skirtingi rezultatai stebimi HT29 ląstelių linijoje po poveikio JS 6 Gy ar 5x2 Gy doze 2D modelinėje sistemoje. HT29/PARP12^{-}, HT29/PARP13^{-}, HT29/PARP14^{-} išgyvenamumas yra žymiai mažesnis, nei laukinio tipo HT29 ląstelių. Taip pat pastebėta, kad PARP13 baltymas HT29 ląstelėse yra ypatingai svarbus išgyvenamumui po frakcionuotos JS dozės (išgyvenusių ląstelių dalis ~ 0,07).

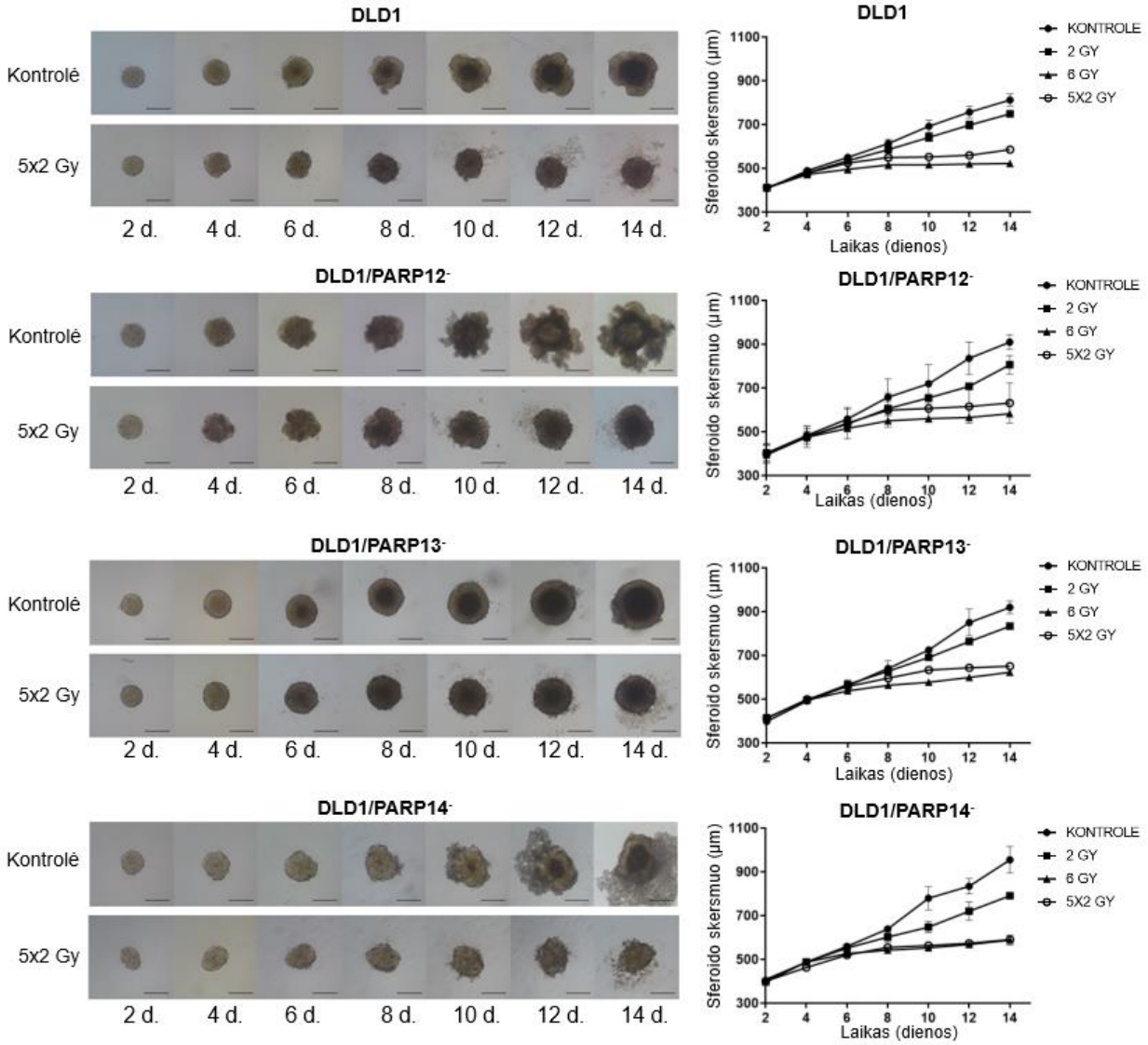
Lyginant išgyvenamumą ląstelėse augintose 3D-M modelinėje sistemoje pastebėta, kad abiejose ląstelių linijose po poveikio JS 6 Gy ar 5x2 Gy JS doze PARP genų raiškos sumažėjimas reikšmingai lemia šių sublinijų ląstelių gyvybingumą. Jautriausiai į JS poveikį DLD1 ląstelėse reagavo PARP14 mutantai (po 5x2 Gy išgyvenusių ląstelių dalis ~ 0.55), o HT29 ląstelėse – PARP13 mutantai (po 5x2 Gy išgyvenusių ląstelių dalis ~ 0,49).

Skirtumai tarp rezultatų gautų ląsteles auginant skirtingose modelinėse sistemose galėjo atsirasti dėl kelių priežaščių: 1) tarpląstelinio užpildo standumas skatina mikroRNR sintezę, kurios mažina vėžio supresoriaus PTEN raišką ir aktyvinamas PI3K/Akt signalinis kelias (skatinantis ląstelių augimą ir išgyvenamumą); 2) adhezija su tarpląstelinio užpildo molekulėmis inaktyvuoja apoptozę skatinančias molekules (BAX) bei padidina „anti-apoptotinių“ genų raišką (BCL2); 3) ribota difuzija ir hipoksija sąlygoja padidėjusią genų atsakingų už išgyvenamumą ir atsparumą genotoksinėms molekulėms raišką (HIF-1); 4) įvyksta metabolinis vėžinių ląstelių perprogramavimas (Warburgo efektas), kai ląstelės dažniau naudoja anaerobinę glikolizę reguliaciniams procesams – baltymų sintezei bei ląstelių dalijimuisi (Edmondson *et al*. 2014; Pickup *et al.* 2014). PARP14 sublinijos ląstelių išgyvenamumas 3D modelinėje sistemoje gali būti siejamas su tuo, kad PARP14 įeina į sutelktinių adhezijų (angl. *focal adhesion*) kompleksus ir taip reguliuoja ląstelių prisitvirtinimą prie paviršiaus. Vyas su kolegomis pastebėjo, kad fibroblastai su išveiklintu PARP14 genu sunkiau atkimba nuo paviršiaus ir stipriau prisitvirtina tapusavyje. Manoma, kad kuo tampresnės tarpląstelinės jungtys, tuo ląstelės yra labiau atsparios genotoksinių agentų poveikiui (Vyas *et al*. 2013).

PARP mutantų auginimas trečioje modelinėje sistemoje buvo naudojamas norint palyginti ląstelių išgyvenamumą po poveikio JS 2D kitoje 3D modelinėje sistemoje.

Po užsėjimos antrą auginimo dieną visų ląstelių sublinijų sferoidų vidutinis skersmuo lygus ~400 μm. Nešvitinti laukinio tipo DLD1 ląstelių sferoidai per 2 savaites užaugo iki 818 ± 27 μm, tuo tarpu DLD1/PARP12^{-} – 909 ± 34 μm, DLD1/PARP13^{-} – 919 ± 29 μm, DLD1/PARP14^{-} – 955 ± 45 μm (12 pav.). Kadangi PARP mutantai suformuoja didesnius sferoidus, tai galima manyti, kad PARP12, PARP13 ir PARP14 genų išveiklinimas pakeičia tarpląstelines sąveikasko pasekoje keičiasi erdvinės ląstelių struktūros (sferoido) kompaktiškumas.

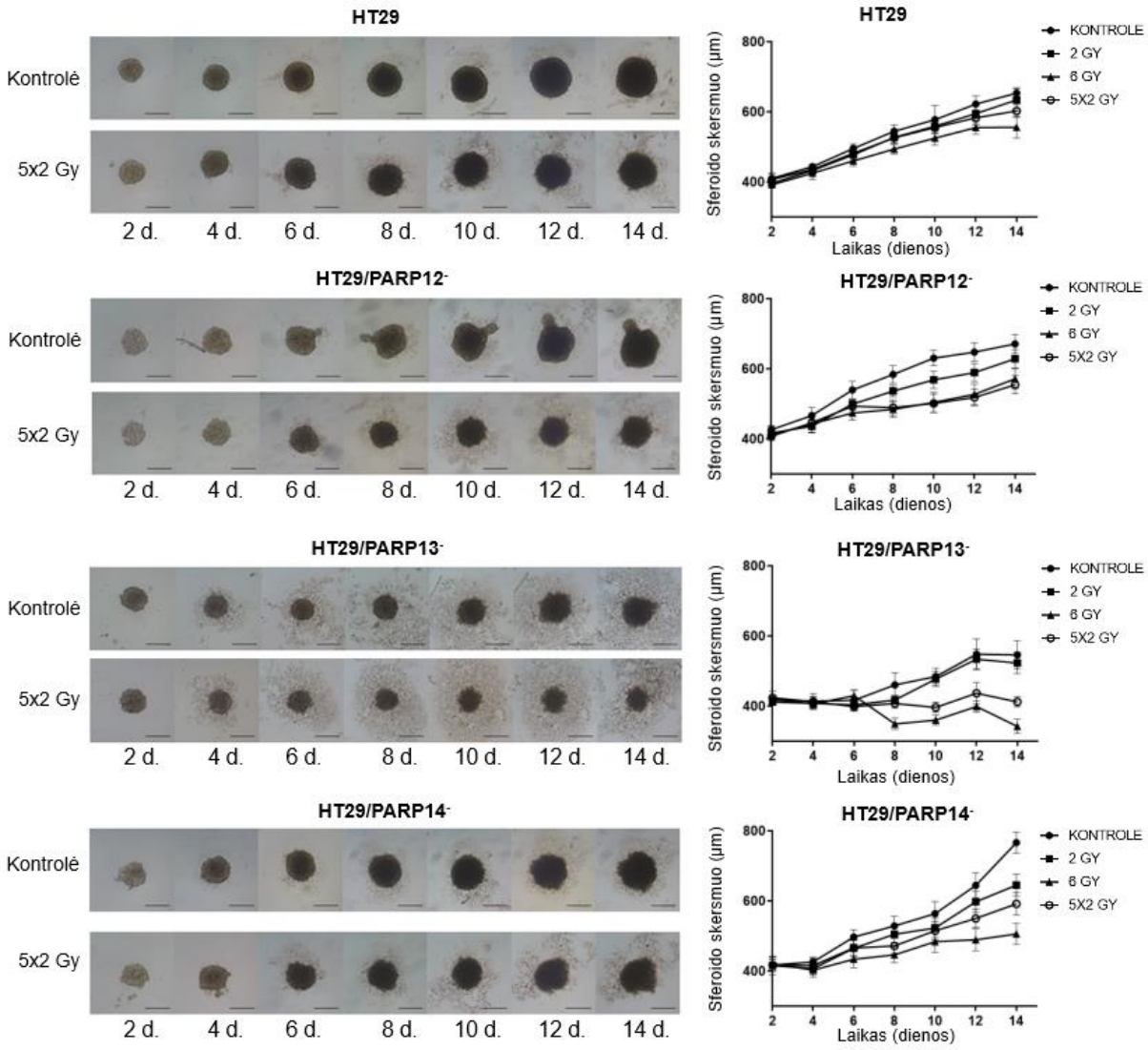
Didžiausią poveikį ląstelių išgyvenamumui turėjo frakcionuota 5x2 Gy bei vienkartinė 6 Gy JS dozės. Paveikus sferoidus 5x2 Gy arba 6 Gy dozėmis, pastebėta, kad aštuntą auginimo dieną ląstelės pradeda augti lėčiau arba jų augimas išvis sustoja. Paveikus sferoidus vienkartine 2 Gy doze jų augimo dinamika pakinta nežymiai ir išlieka tolygi, kaip ir nešvitintų sferoidų. 14 auginimo dieną DLD1 sferoidų švitintų JS 6 Gy doze dydis lyginant su JS neveiktais yra 1,55 karto mažesnis. Panašus dydžio mažėjimas stebimas ir PARP mutantuose: DLD1/PARP12$^-$ po poveikio 6 Gy JS dydis sumažėja 1,56 karto, DLD1/PARP13$^-$ – 1,47 karto, o DLD1/PARP14$^-$ – 1,62 karto. Kadangi išgyvenamumas visose DLD1 ląstelių sublinijose yra panašus, tai galima teigti, kad DLD1 ląstelių linijoje PARP12, PARP13 ir PARP14 genai išgyvenamumui didelės įtakos neturi.



12 pav. DLD1 sferoidų morfologija bei vidutinis skersmuo 14 dienų laikotarpiu. Visų švitinamų bei kontrolinių sferoidų skersmuo antra diena lygus ~400 µm (~ 0,032 mm^3). Mąstelis atitinka 500 µm.

Iš sferoidų morfologijos matyti, kad DLD1/PARP13$^-$ visą augimo laikotarpį išlaiko idealią sferos formą. Tuo tarpu, nešvitinti DLD1, DLD1/PARP12$^-$ ir DLD1/PARP14$^-$ sferoidai 10 auginimo diena pradeda formuoti netolygios formos struktūras. Taip pat, pastebėta, kad po poveikio 6 Gy arba 5x2 Gy JS doze (paveiksle pavaizduoti tik po poveikio 5x2 Gy doze) visą auginimo laikotarpį sferoidai yra mažesni ir taisyklingos formos. Žinoma, kad sferoiduose didesniuose nei 550-600 µm skersmens susidaro deguonies bei maistinių medžiagų gradientas, ko pasekoje formuojasi nekrotinių ląstelių populiacija. Todėl 6-10 dienomis šviesinėse nuotraukose sferoido centre matomas patamsėjimas gali būti siejamas su nekrotinių zonų atsiradimu. Bendrai, sferoidams yra būdingas zoninis pasiskirstymas, kai paviršiuje vyrauja proliferuojančios ląstelės, toliau centro link – ramybės būsenoje esančios ląstelės bei giliausiai stebimas nekrotinis centras (Lin ir Chang 2008).

HT29 sferoidų išgyvenamumas pateikiamas 13 paveiksle (13 pav.)



13 pav. HT29 sferoidų morfologija bei vidutinis skersmuo 14 dienų laikotarpiu. Visų švitinamų bei kontrolinių sferoidų skersmuo antra diena lygus ~400 µm (~ 0,032 mm^3). Mąstelis atitinka 500 µm.

Nešvitinti laukinio tipo HT29 ląstelių sferoidai per 2 savaites užaugdavo iki 653 ± 14 μm, tuo tarpu HT29/PARP12$^-$ – 671 ± 27 μm, HT29/PARP13$^-$ – 546 ± 40 μm, HT29/PARP14$^-$ – 766 ± 30 μm (13 pav.). Kaip ir DLD1 ląstelių atveju HT29 sferoidai turintys išveiklintą PARP12 ir PARP14 geną yra didesnio dydžio negu laukinio tipo HT29. Tuo tarpu išveiklinus PARP13 geną, HT29 ląstelių sferoidai būna mažesni. Todėl galima manyti, kad genų išveiklinimas galimai pakeičia tarpląstelinių jungčių stiprumą ir/arba padidina proliferacijos potencialą.

14-tą auginimo dieną HT29 sferoidų švitintų 6 Gy JS dydis lyginant su JS neveiktais yra 1,18 karto mažesnis. Panašus dydžio mažėjimas stebimas ir PARP12 mutantuose – po 6 Gy dozės sferoidas sumažėja 1,18 karto. Tuo tarpu PARP13 ir PARP14 mutantai jautriai reagavo į 6 Gy JS poveikį, DLD1/PARP13$^-$ sumažėjo 1,60 karto, o DLD1/PARP14$^-$ – 1,52 karto.

Analizuojant HT29 sferoidų morfologiją, pastebėta, kad HT29, HT29/PARP12$^-$ ir HT29/PARP14$^-$ po švitinimo, 6-8 diena padidėja nuo sferoidų atkibusių ląstelių dalis. Tuo tarpu nešvitintuose sferoiduose toks elgesys pastebimas tik 8-10 dienomis. Išveiklinus PARP13 jau nuo 4 auginimo dienos galimai susilpnėja tarpląstelinės jungtys, dėl ko padidėja atkibusių ląstelių dalis.

Apibendrinant galima teigti, kad PARP13 išveiklinimas HT29 ląstelėse galimai sumažina ląstelių proliferacijos potencialą bei susilpnina ląstelių adhezines savybes. DLD1 ląstelių linijoje jautriausiai į JS poveikį reagavo PARP14 mutantai, o HT29 – PARP13. Taip pat PARP genų išveiklinimas pakeičia ląstelių bei formuojamų sferoidų morfologiją, kas gali sąlygoti, kad šie genai yra svarbūs tarpląstelinių jungčių formavime.

IŠVADOS

1. Ląstelės ciklo, imuninio atsako ir DNR pažaidų taisymo ontologinių procesų koekspresinė analizė atskleidė, kad genai ANKRA2 ir SHCBP1 gali būti potencialiais spindulinės terapijos veiksmingumo didinimo taikiniais.
2. Ląstelių DLD1 ir iVKL-DLD1 atsako į poveikį frakcionuota JS doze metu aktyvinami tie patys signaliniai keliai: ląstelės ciklo, DNR pažaidų taisymo bei imuninio atsako, tačiau skiriasi juose dalyvaujantys genai bei jų reguliacija.
3. Vėžinių ląstelių jautrumas jonizuojančiajai spinduliuotei priklauso nuo jas supančios mikroaplinkos. PARP genų išveiklinimas pakeičia DLD1 ir HT29 ląstelių morfologiją, o PARP14 išveiklinimas DLD1 bei PARP13 išveiklinimas HT29 ląsteles įjautrina spinduliuotės poveikiui.

Daniel Naumovas .....

(Vardas, pavardė) (Parašas)

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1 ABBOTTS, R.; WILSON, D. Coordination of DNA single strand break repair. *Free Radic Biol Med*, 2017, Vol. 107, p. 228–244.
2 AHMED, K.; LI, J. ATM-NF-κB Connection as a Target for Tumor Radiosensitization. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, Vol. 7, No. 4, p. 335–342.
3 ALEXANDER, A.; WALKER, C. Differential localization of ATM is correlated with activation of distinct downstream signaling pathways. *Cell Cycle*, 2010, Vol. 9, No 18, p. 3685–3696.
4 ALI, H.; DAWSON, S.; BLOWS, F.; PROVENZANO, E.; PHAROAH, P.; CALDAS, C. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 2011, Vol. 13, No. 6, p. 1–15.
5 ANDRES, S.; WILLIAMS, R. CtIP/Ctp1/Sae2, molecular form fit for function. *DNA Repair (Amst)*, 2017, Vol. 56, p. 109–117.
6 APARICIO, T.; BAER, R.; GAUTIER, J. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repai (Amst)*, 2014, Vol. 19, p. 169–175.
7 BAE, K.; DAI, Y.; VIEWEG, J.; SIEMANN, D. Hypoxia regulates SOX2 expression to promote prostate cancer cell invasion and sphere formation. *Am J Cancer Res*, 2016, Vol. 6, No. 5, p. 1078–1088.
8 BALBOUS, A.; CORTES, U.; GUILLOTEAU, K.; RIVET, P.; PINEL, R.; DUCHESNE, M.; GODET, J.; BOISSONNADE, O.; WAGER, M.; BENSADOUN, R.; CHOMEL, J.; KARAYAN-TAPON, L. A radiosensitizing effect of RAD51 inhibition in glioblastoma stem-like cells. BMC Cancer., 2016, Vol. 16, No. 604.
9 BASKAR, R.; LEE, K.; YEO, R.; YEOH, K. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *Int J Med Sci*, 2012, Vol. 9, No. 3, p. 193–199.
10 BITLER, B.; WATSON, Z.; WHEELER, L.; BEHBAKT, K. PARP inhibitors: Clinical utility and possibilities of overcoming resistance. *Gynecol Oncol*, 2017, Vol. 147, No. 3, p. 695–704.
11 BLANPAIN, C.; MOHRIN, M.; SOTIROPULOU, P.; PASSEGUE, E. DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011, Vol. 8, No. 1, p. 16–29.
12 BONNET, D.; DICK, J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 1997, Vol. 3, No. 7, p. 730–737.
13 BRUNGS, D.; AGHMESHEH, M.; VINE, K.; BECKER, T.; CAROLAN, M.; RANSON, M. Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications. J Gastroenterol., 2016 Vol. 51, No. 4, p. 313–326.
14 BUCZACKI, S. Cancer stem cells. Encyclopedia of cell biology. *Elsevier*, 2016, Vol. 3, p. 807–812.
15 BUDANOV, A.; KARIN, M. The p53-regulated Sestrin gene products inhibit mTOR signaling. *Cell*, 2008, Vol. 134, No. 3, p. 451–460.
16 BURGOS-OJEDA, D.; RUEADA, B.; BUCKANOVICH, R. Ovarian cancer stem cell markers: prognostic and therapeutic implications. *Cancer Lett*, 2012, Vol. 322, No. 1, p. 1–7.
17 CALDECOTT, K. DNA single-strand break repair. Exp Cell Res, 2014, Vol. 329, No. 1, p. 2–8.
18 CALDECOTT, K. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 2008, Vol. 9, No. 8, p. 619–631.
19 CANNAN, W.; PEDERSON, D. Mechanisms and consequences of double-strand DNA break formation in chromatin. *J Cell Physiol*, 2016, Vol. 231, No. 1, p. 3–14.
20 CAPDEVILA-BUSQUETS, E.; BADIOLA, N.; ARROYO, R.; ALCALDE, V.; SOLER-LOPEZ, M.; ALOY, P. Breast cancer genes PSMC3IP and EPSTI1 play a role in apoptosis regulation. *PloS One*, 2015, Vol. 10, No. 1.
21 CATARA, G.; GRIMALDI, G.; SCHEMBRI, L.; SPANO, D.; TURACCHIO, G.; MONTE, M.; BECCARI, A.; VALENTE, C.; CORDA, D. PARP1-produced poly-ADP-ribose causes the PARP12 translocation to stress granules and impairment of Golgi complex functions. *Sci Rep*, 2017, Vol. 7, No. 14035.
22 CHEN, J.; XIA, Q.; JIANG, B.; CHANG, W.; YUAN, W.; MA, Z.; LIU, Z.; SHU, X. Prognostic Calue of cancer stem cell marker ALDH1 expression in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*., 2015, Vol. 10, No. 12.
23 CHEN, W.; WONG, C.; VOSBURGH, E.; LEVINE, A.; FORAN, D.; XU, E. High-throughput image analysis of tumor spheroids: a user-friendly software application to measure the size of spheroids automatically and accurately. *J Vis Exp*, 2014, Vol. 89, No. 51639.
24 CHERCIU, I.; BARBALAN, A.; PIRICI, D.; MARGARITESCU, C.; SAFTOIU, A. Stem cells, colorectal cancer and cancer stem cell markers correlations. *Curr Health Sci J*., 2014, Vol. 40, No, 3, p. 153–161.
25 CHETRY, M.; LI, S.; LIU, H.; HU, X.; ZHU, X. Prognostic values of aquaporins mRNA expression in human ovarian cancer. *Biosci Rep*, 2018, Vol. 38, No. 2.
26 CHEUNG, T.; RANDO, T. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, Vol. 14, No. 6.

27 CISZEWSKI, W.; TAVECCHIO, M.; DASTYCH, J.; CURTIN, N. DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, Vol. 143, No. 1, p. 47–55.
28 DALLAS, M.; LIU, G.; CHEN, W.; THOMAS, S.; WIRTZ, D.; HUSO, D.; KONSTANTOPOULOS, K. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *Faseb J*, 2012, Vol. 26, No. 6, p. 2648–2656.
29 DAUGHERTY, M.; YOUNG, J.; KERNS, J.; MALIK, H. Rapid evolution of PARP genes suggests a broad role for ADP-ribosylation in host-virus conflicts. *PloS Genet*, 2014, Vol. 10, No. 5.
30 DESPUKY, O.; DING, N.; ZHOU, G. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. *J Radiat Res Appl Sci*, 2015, Vol. 8, No. 2, p. 247–254.
31 DING, Y.; GAO, H.; ZHANG, Q. The biomarkers of leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Investig*, 2017, Vol.4, No. 19.
32 DU, L.; WANG, H.; HE, L.; ZHANG, J.; NI, B.; WANG, X.; JIN, H., CAHUZAC N., MEHRPOUR M., LU Y., CHEN Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 2008, Vol. 14, No. 21, p. 6751–6760.
33 EDMONDSON, R.; BROGLIE, J.; ADCOCK, A.; YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*, 2014, Vol. 12, No. 4, p. 207-218.
34 EFIMOVA, E.; LIANG, H.; PITRODA, S.; LABAY, E.; DARGA, T.; LEVINA, V.; LOKSHIN, A.; ROIZMAN, B.; WEICHSELBAUM, R. KHODAREV, N. Radioresistance of Stat1 over-expressing tumour cells is associated with suppressed apoptotic response to cytotoxic agents and increased IL6-IL8 signalling. *Int J Radiat Biol*, 2009, Vol. 85, No. 5, p. 421–431.
35 ERFANI, E.; ROUDI, R.; RAKSHAN, A.; SABET, M.; SHARIFTABRIZI, A.; MADJD, Z. Comparative expression analysis of putative cancer stem cell markers CD44 and ALDH1A1 in various skin cancer subtypes. *Int J Biol Markers*, 2016, Vol. 31, No. 1, p. 53–61.
36 ESPERSEN, M.; OLSEN, J.; LINNEMANN, D.; HOGDALL, E.; TROELSEN, J. Clinical implications of intestinal stem cell markers in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*., 2015, Vol. 14, No. 2, p. 63-71.
37 EVANS, E.; STAFFURTH, J. Principles of cancer treatment by radiotherapy. *Surgery (Oxford)*, 2018, Vol. 36, No. 2, p. 1–6.
38 FENG, W.; LI, H.; XU, K.; CHEN, Y.; PAN, L.; MEI, Y.; CAI, H.; JIANG, Y.; CHEN, T.; FENG, D. SHCBP1 is over-expressed in breast cancer and is important in the proliferation and apoptosis of the human malignant breast cancer cell line. Gene, 2016, Vol. 587, No. 1, p. 91–97.
39 FINLAY, D.; TERIETE, P.; VAMOS, M.; COSFORD, N.; VUORIB, K. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Res*, 2017, Vol.6, No. 587.
40 FOKAS, E.; PREVO, R.; POLLARD, J.; REAPER, P.; CHARLTON, P.; CORNELISSEN, B.; VALLIS, K.; HOMMOND, E.; OLCINA, M.; GILLIES, W.; MUSCHEL, R.; BRUNNER, T. Targeting ATR in vivo using the novel inhibitor VE-822 results in selective sensitization of pancreatic tumors to radiation. *Cell Death Dis*, 2012, Vol. 3, No. 441.
41 FOUQUIN, A.; GUIROUILH, J.; LOPEZ, B.; HALL, J.; AMOR-GUERET, M.; PENNANEACH, V. PARP2 controls double-strand break repair pathway choice by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites and promoting end-resection. *Nucleic Acids Res*, 2017, Vol. 45, No. 21, p. 12325–12339.
42 FU, D.; CALVO, J.; SAMSON, L. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nat Rev Cancer*, 2012, Vol. 12, No. 2, p. 104–120.
43 FU, T.; WU, C.; LIN, Y.; LIOU, H.; TSENG, Y.; SHU, C.; TSAI, K.; YEN, L.; TSENG, H.; TSENG, C.; GER, L.; LIU, P. Subsite-specific association of DEAD box RNA helicase DDX60 with the development and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, No. 51, p. 85097–85108.
44 FURTH, J.; MORTON, C.; CHARLES, B. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am J Cancer*, 1937, Vol. 31, No. 2, p. 276–282.
45 GAGNE, J.; ISABELLE, M.; LO, K.; BOURASSA, S.; HENDZEL, M.; DAWSON, V.; DAWSON, T.; POIRRIER, G. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res*, 2008, Vol. 36, No. 22, p. 6959–6976.
46 GALLOWAY, N.; ASPE, J.; SELLERS, C.; WALL, N. Enhanced antitumor effect of combined gemcitabine and proton radiation in the treatment of pancreatic cancer. *Pancreas*, 2009, Vol. 38, No. 7, p. 782–790.
47 GAO, F.; KWON, S.; ZHAO, Y.; JIN, Y. PARP1 poly(ADP-ribosyl)ates Sox2 to control Sox2 protein levels and FGF4 expression during embryonic stem cell differentiation. *J Biol Chem*, 2009, Vol, 284, No. 33, p. 22263–22273.
48 GASTON, J.; CHERADAME, L.; YVONNET, V.; DEAS, O.; POUPON, M.; JUDDE, J.; CAIRO, S.; GOFFIN, V. Intracellular STING inactivation sensitizes breast cancer cells to genotoxic agents. Oncotarget, 2016, Vol. 7, No. 47, p. 77205–77224.
49 GEVAERT, O.; PLEVRIS, S. Identifying master regulators of cancer and their downstream targets by integrating genomic and epigenomic features. *Pac Symp Biocomput*, 2014, p. 123–134.

50 GOARDON, N.; MARCHI, E.; ATZBERGER, A.; QUEK, L.; SCHUH, A.; SONEJI, S.; WOLL, P.; MEAD, A.; ALFORD, K.; ROUT, R.; CHAUDHURY, S.; GILKES, A.; KNAPPER, S.; BELDJORD, K.; BEGUM, S.; ROSE, S.; GEDDES, N.; GRIFFITHS, M.; STANDEN, G.; STERNBERG, A.; CAVENAGH, J.; HUNTER, H.; BOWEN, D.; KILLICK, S.; ROBINSON, L.; PRICE, A.; MARCINTYRE, E.; VIRGO, P.; BURNETT, A.; CRADDOCK, C.; ENVER, T.; JACOBSEN, S.; PORCHER, C; VYAS, P. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 2011, Vol. 19, No. 1. P. 138–152.
51 GODOY, P.; MELLO, S.; MAGALHAES, D.; DONAIRES, F.; NICOLUCCI, P.; DONADI. E.; PASSOS, G.; SAKAMOTO-HOJO, E. Ionizing radiation-induced gene expression changes in TP53 proficient and deficient glioblastoma cell lines. Mutant Res., 2013, Vol. 756, No. 1-2, p. 46–55.
52 GOKMEN-POLAR, Y.; NAKSHATRI, H.; BADVE, S. Biomarkers for breast cancer stem cells: the challenges ahead. *Biomark Med*., 2011, Vol. 5, p. 661–671.
53 HARDAVELLA, G.; GEORGE, R.; SETHI, T. Lung cancer stem cells - characteristics, phenotype. Transl Lung *Cancer Res*, 2016, Vol. 5, No. 3, p. 272–279.
54 HASSAN, M.; WATARI, H.; ALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int*, 2014, Vol. 150845.
55 HONSCHEID, P.; DATTA, K.; MUDERS, M. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *Int J Radiat Biol*, 2014, Vol. 90, No. 8, p. 628–635.
56 HORI, T.; KONDO, T.; KANAMORI, M.; TABUCHI, Y.; OGAWA, R.; ZHAO, Q.; AHMED, K.; YASUDA, T.; SEKI, S.; SUZUKI, K.; KIMURA, T. Ionizing radiation enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulations of death receptor 4 (DR4) and death receptor 5 (DR5) in human osteosarcoma cells. *J Orthop Res*, 2010, Vol. 28, No. 6, p. 739–745.
57 HORTON, S.; HUNTLY, B. Recent advances in acute myeloid leukemia stem cell biology. *Haematologica*, 2012, Vol. 97, No. 7, p. 966–974.
58 HOSEN, N.; PARK, C.; TATSUMI, N.; OJI, Y.; SUGIYAMA, H.; GRAMATZKI, M.; KRENSKY, A.; WEISSMAN, I. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, Vol. 104, No. 26, p. 11008–11013.
59 HWANG-VERSLUES, W.; LEE, W.; LEE, E. Biomarkers to target heterogeneous breast cancer stem cells. *J Mol Biomark Diagn*, 2012, Vol. 8, p. 1–13.
60 YU, L.; SHANG, Z.; HSU, F.; ZHANG, Z.; TUMATI, V.; LIN, Y.; CHEN, B.; SAHA, D. NSCLC cells demonstrate differential mode of cell death in response to the combined treatment of radiation and a DNA-PKcs inhibitor. *Oncotarget*, 2015, Vol. 6, No. 6, p. 3848–3860.
61 JAN, M.; CHAO, M.; CHA, A.; ALIZADEH, A.; GENTLES, A.; WEISSMAN, I.; MAJETI, R. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, Vol. 108, No. 12. p. 5009–5014.
62 JIANG, Z.; WU, D.; LIN, S.; LI, P. CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia. *Biomark Res*, 2016, Vol. 4, No. 23.
63 JINUSHI, M.; CHIBA, S.; YOSHIYAMA, H.; MASUTOMI, K.; KINOSHITA, I.; DOSAKA-AKITA, H.; YAGITA, H.; TAKAOKA, A.; TAHARA, H. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, Vol. 108, No. 30, p. 12425–12430.
64 KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, 2013, Vol. 38, No. 2, p. 209–223.
65 KHAJAH, M.; LUQMANI, Y. Role of aquaporins in breast cancer progression and metastasis. *Intech*, 2016, p. 59-83.
66 KHALEK, F.; GALLICANO, G.; MISHA, L. Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res*., 2010, p. S16–S23.
67 KIM, D.; CHO, S.; CHANG, S.; LEE, H.; BLOCK, J.; HEI, T.; LEE, F. Targeting of cell survival genes using small interfering RNAs (siRNAs) enhances radiosensitivity of Grade II chondrosarcoma cells. *J Orthop Res*, 2007, Vol. 25, Bo. 6, p. 820–828.
68 KING, H.; BREND, T.; PAYNE, H.; WRIGHT, A.; WARD, T.; PATEL, K.; EGNUNI, T.; STEAD, L.; PATEL, A.; WURDAK, H.; SHORT, S. RAD51 Is a Selective DNA Repair Target to Radiosensitize Glioma Stem Cells. Stem Cell Reports., 2017, Vol. 8, No. 1, p. 125–139.
69 KO, A.; KANEHISA, A.; MARTINS, I.; SENOVILLA, L.; CHARGARI, C.; DUGUE, D.; MARINO, G.; KEPP, O.; MICHAUD, M.; PERFETTINI, J.; KROEMER, G.; DEUTSCH, E. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ*, 2014, Vol. 21, No. 1, p. 92–99.
70 KO, H.; REN, E. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules*, 2012, Vol. 2, No. 4, p. 524–548.
71 KOPNIN, P.; AGAPOVA, L.; KOPNIN, B.; CHUMAKOV, R. Repression of Sestrin family genes contributes to oncogenic ras-induced ROS up-regulation and genetic instability. *Cancer Res*, 2007, Vol. 67, No. 10, p. 4671–4678.

72 KOUKOURAKIS, M.; KAKOURATOS, C.; KALAMIDA, D.; BAMPALI, Z.; MAVROPOULOU, S.; SIVRIDIS, E.; GIATROMANOLAKI, A. Hypoxia-inducible proteins HIF1α and lactate dehydrogenase LDH5, key markers of anaerobic metabolism, relate with stem cell markers and poor post-radiotherapy outcome in bladder cancer. *Int J Radiat Biol*, 2016, Vol. 92, No. 7, p. 353–363.
73 KRAUSE, M.; DUBROVSKA, A.; LINGE, A.; BAUMANN, M. Cancer stem cells: Radioresistance, prediction of radiotherapy outcome and specific targets for combined treatments. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, Vol. 15, No. 109, p. 63–73.
74 KURIBAYASHI, K.; FINNBERG, N.; JEFFERS, J.; ZAMBETTI, G.; EL-DEIRY, W. The relative contribution of pro-apoptotic p53 target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle*, 2011, Vol. 10, No. 14, p. 2380–2389.
75 KUTUZOV, M.; KHODYREVA, S.; SCHREIBER, V.; LAVRIK, O. The role of PARP2 in DNA repair. *Mol Biol (Mosk)*, 2014, Vol. 48, No. 4, p. 561–572.
76 LA, P.; ZAPPERI, S. Human breast and melanoma cancer stem cells biomarkers. *Cancer Lett*., 2013, Vol. 338, No. 1, p.69–73.
77 LANGAN, R.; MULLINAX, J.; RAIJI, M.; UPHAM, T.; SUMMERS, T.; STOJADINOVIC, A.; AVITAL, I. Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells. *J Cancer*, 2013, Vol. 4, No, 3, p. 241–250.
78 LANGFELDER, P.; HORVATH, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 2008 Vol. 559, No. 9.
79 LANGFELDER, P.; ZHANG, B.; HORVATH S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. *Bioinformatics*, 2008, Vol, 24, No. 5, p. 719-720.
80 LAU, E.; CHENG, B.; MA, M.; LEE, J.; CHAI, S.; LIN, C.; TSANG, S.; MA, S.; NG, I.; LEE, T. Cancer-associated fibroblasts regulate tumor-initiating cell plasticity in hepatocellular carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 signaling. *Cell Rep*, 2016, Vol. 15, No. 6, p. 1175–1189.
81 LAU, E.; HO, N.; LEE, T. Cancer stem cells and their microenvironment: biology and therapeutic implications. *Stem Cells Int*, 2017, No. 3714190.
82 LEE, M.; LEE, J. Exploiting tumor cell senescence in anticancer therapy. *BMB Rep*, 2014, Vol. 47, No. 2, p. 51–59.
83 LEIKAM, C.; HUFNAGEL, A.; OTTO, C.; MURPHY, D.; MUHLING, B.; KNEITZ, S.; NANDA, I.; SCHIMD, M.; WAGNER, T.; HAFERKAMP, S.; BROCKER, E.; SCHARTL, M.; MEIERJOHANN, S. In vitro evidence for senescent multinucleated melanocytes as a source for tumor-initiating cells. *Cell Death Dis*, 2015, Vol. 2, No. 6.
84 LEUNG, A.; VYAS, S.; ROOD, J.; BHUTKAR, A.; SHARP, P.; CHANG, P. Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol Cell*, 2011, Vol. 42, No. 4, p. 489–499.
85 LI, G.; KAWASHIMA, H.; OGOSE, A.; ARIIZUMI, T.; HOTTA, T.; KUWANO, R.; URATA, Y.; FUJIWARA, T.; ENDO, N. Telomelysin shows potent antitumor activity through apoptotic and non-apoptotic cell death in soft tissue sarcoma cells. *Cancer Sci*, 2013, Vol. 104, No. 9, p. 1178–1188.
86 LI, N.; FENG, L.; LIU, H.; WANG, J.; KASEMBELI, M.; TRAN, M.; TWEARDY, D.; LIN, S.; CHEN J. PARP inhibition suppresses growth of EGFR-mutant cancers by targeting nuclear PKM2. *Cell Rep*, 2016, Vol. 15, No. 4, p. 843-856.
87 LI, S.; WEI, Q.; LI, Q.; ZHANG, B.; XIAO, Q. Down-regulating HIF-1α by lentivirus-mediated shRNA for therapy of triple negative breast cancer. *Cancer Biol Ther*, 2015, Vol. 16, No. 6, p. 866-875.
88 LIEBER, M. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. *Annu Rev Biochem*, 2010, Vol. 79, p. 181–211.
89 LIN, J.; DING, D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int*, 2017, Vol. 17, No. 8.
90 LIN, R.; CHANG, H. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*, 2008, Vol. 3, No. 9-10, p. 1172-1184.
91 LIOU, G.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*, 2010, Vol. 44, No. 5.
92 LIU, B.; BHATT, D.; OLTVAI, Z.; GREENBERGER, J.; BAHAR, I. Significance of p53 dynamics in regulating apoptosis in response to ionizing radiation, and polypharmacological strategies. *Sci Rep*, 2014, Vol. 4, No. 6245.
93 LIU, H.; LATHIA, J. Cancer stem cells. First edition. Targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Elsevier*, 2016.
94 LIU, Y.; KADYROV, A.; MODRICH, P. PARP-1 enhances the mismatch-dependence of 5′-directed excision in human mismatch repair in vitro. *DNA Repair (Amst)*, 2011, Vol. 10, No. 11, p. 1145–1153.
95 LIVAK, K.; SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Method*, 2001, Vol. 25, No. 4, p. 402–408.
96 LOU, D.; ZHU, L.; DING, H.; DAI, H.; ZOU, G. Aberrant expression of redox protein Ape1 in colon cancer stem cells. *Oncol Lett*, 2014, Vol. 7, No. 4, p. 1078–1082.
97 LU, H.; CLAUSER, K.; TAM, W.; FROSE, J.; YE, X.; EATON, E.; REINHARDT, F.; DONNENBERG, V.; BHARGAVA, R.; CARR, S.; WEINBERG, R. A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nat Cell Biol*, 2014, Vol. 16, No. 11, p. 1105–1117.

98 LUO, H.; YOUNT, C.; LANG, H.; YANG, A.; RIEMER, E.; LYONS, K.; VANEK, K.; SILVESTRI, G.; SCHULTE, B.; WANGA, G. Activation of p53 with Nutlin-3a radiosensitizes lung cancer cells via enhancing radiation-induced premature senescence. *Lung Cancer*, 2013, Vol. 81, No. 2, p. 167–173.
99 MA, I.; ALLAN, A. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev*, 2011, Vol. 7, No. 2, p. 292–306.
100 MAHANEY, B.; MEEK, K.; LEES-MILLER, S. Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J*, 2009, Vol. 417, No.3, p. 639–650.
101 MAJETI, R.; CHAO, M.; ALIZADEH, A.; PANG, W.; JAISWAL, S.; GIBBS, K.; ROOIJEN, N.; WEISSMAN, I. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 2009, Vol. 138, No. 2, p. 286–299.
102 MALTSEVA, E.; RECHKUNOVA, N.; SUKHANOVA, M.; LAVRIK, O. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 modulates interaction of the nucleotide excision repair factor XPC-RAD23B with DNA via poly(ADP-ribosyl)ation. *J Biol Chem*, 2015, Vol. 290, No. 36, p. 21811–21820.
103 MCILWAIN, D.; BERGET, T.; MAK, T. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, Vol. , No. 4.
104 MENG, M.; WANG, H.; CUI, Y.; WU, Z.; SHI, Y.; ZAORSKY, N.; DENG, L.; YUAN, Z.; LU, Y.; WANG, P. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget*, 2016, Vol. 7, No. 35, p. 57391–57413.
105 MIYATA, T.; YOSHIMATSU, T.; SO, T.; OSYAMA, T.; YRAMOTE, H.; OSAKI, T.; NAKANISHI, R.; TANAKA, F.; NAGAYA, H.; GOTOH, A. Cancer stem cell markers in lung cancer. *Pers Med Universe*, 2015, Vol. 4, p. 40–45.
106 MILAM, K.; CLEAVER, J. Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science*, 1984, Vol. 223, No. 4636, p. 589–591.
107 MORALES, J.; LI, L.; FATTAH, F.; DONG, Y.; BEY, E.; PATEL, M.; GAO, J.; BOOTHMAN, D. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014, Vol. 24, No. 1, p. 15–28.
108 MOUTAOUFIK, M.; FATIMY, R.; NASSOUR, H.; GAREAU, C.; LANG, J.; TANGUARY, R.; MAZROUI, R.; KHANDJIAN, E. UVC-induced stress granules in mammalian cells. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, No. 11.
109 MUKHOPADHYAY, P.; HORVATH, B.; KECHRID, M.; TANCHIAN, G.; RAJESH, M.; NAURA, A.; BOULARES, A.; PACHER, P. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a key mediator of cisplatin-induced kidney inflammation and injury. *Free Radic Biol*, 2011, Vol. 51, No. 9, p. 1774–1788.
110 MURAKI, K.; HAN, L.; MURNANE, J. The role of ATM in the deficiency in nonhomologous end-joining near telomeres in a human cancer cell line. *PloS Genet*, 2013, Vol. 9, No. 3.
111 MURCIA, J.; RICOUL, M.; TARTIER, L.; NIEDERGANG, C.; HUBER, A.; DANTZER, F.; SCHREIBER, V.; AME, J.; DIERICH, A.; LEMEUR, M.; SABATIER, L.; CHAMBON, P.; MURCIA, G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J*, 2003, Vol. 22, No. 9, p. 2255–2263.
112 NEHS, M.; LIZ, C.; KOZONO, D.; WHANG, E.; CHO, N.; ZHU, K.; MOALEM, J.; MOORE, F.; RUAN, D. Necroptosis is a novel mechanism of radiation-induced cell death in anaplastic thyroid and adrenocortical cancers. *Surgery*, 2011, Vol. 150, No. 6, p. 1032–1039.
113 PACHER, P.; LIAUDET, L.; MABLEY, J.; CZIRAKI, A.; HASKO, G.; SZABO, C. Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure. *Int J Mol Med*, 2006, Vol. 17, No. 2, p. 369–375.
114 PALUMBO, S.; PIRTOLI, L.; TINI, P.; CEVENINI, G.; CALDERARO, F.; TOSCANO, M.; MIRACCO, C.; COMINCINI, S. Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing irradiation and temozolomide combined treatments. *J Cell Biochem*, 2012, Vol. 113, No. 7, p. 2308-2318.
115 PANGANIBAN, R.; SNOW, A.; DAY, R. Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int J Mol Sci*, 2013, Vol. 14, No. 8, p. 15931–15958.
116 PARIKH, N.; HILSENBECK, S.; CREIGHTON, C.; DAYARAM, T.; SHUCK, R.; SHINBROT, E.; XI, L.; GIBBS, R.; WHEELER, D.; DONEHOWER, L. *J Pathol*, 2014, Vol., 232, No. 5, p. 522–533.
117 PARMIANI, G. Melanoma cancer stem cells: markers and functions. Cancers, 2016, Vol. 8, No. 34, p. 1–5.
118 PATEL, H.; MODI, S.; CHIOSIS, G.; TALDONE, T. Advances in the discovery and development of heat-shock protein 90 inhibitors for cancer treatment. *Expert Opin Drug Discov*., 2011, Vol. 6, No. 5, p. 559–587.
119 PFLAUM, J.; SCHLOSSER, S.; MULLER, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. *Front Oncol*, 2014, Vol. 4, No. 285.
120 PHILLIPS T., MCBRIDE W., PAJONK F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, Vol. 98, No. 24, p. 1777–1785.
121 PICKUP, M.; MOUW, J.; WEAVER, V. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO*, 2014 Vol. 15, No. 12, p. 1243-1253.
122 RAY, S.; BREUER, G.; DEVEAUX, M.; ZELTERMAN, D.; BINDRA, R.; SWEASE, J. DNA polymerase beta participates in DNA End-joining. *Nucleic Acids Res*, 2018, Vol 46, No. 1, p. 242–255.

123 RAMDZAN, Z.; GINJALA, V.; PINDER, J.; CHUNG, D.; DONOVAN, C.; KAUR, S.; LEDUY, L.; DELLAIRE, G.; GANESAN, S.; NEPVEU, A. The DNA repair function of CUX1 contributes to radioresistance. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, No. 12, p. 19021–19038.
124 REYA, T.; MORRISON, S.; CLARKE, M.; WEISSMAN, I. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, Vol. 414, No. 6859, p. 105–111.
125 REINHARDT, H.; SCHUMACHER, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet*, 2012, Vol. 28, No. 3, p. 128–136.
126 RHENEN, A.; DONGEN, G.; KELDER, A., ROMBOUTS E., FELLER N., MOSHAVER B., WALSUM M., ZWEEGMAN, S.; OSSENKOPPELE, G.; SCHUURHUIS, G. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*, 2007, Vol. 110, No. 7, p. 2659–2666.
127 RIESTERER, O.; MATSUMOTO, F.; WANG, L.; PICKETT, J.; MOLKENTINE, D.; GIRI, U.; MILAS, L.; RAJU, U. A novel Chk inhibitor, XL-844, increases human cancer cell radiosensitivity through promotion of mitotic catastrophe. *Invest New Drugs*, 2011, Vol. 29, No. 3, p. 514–522.
128 ROESCH, A.; FUKUNAGA-KALABIS, M.; SCHMIDT, E.; ZABIEROWSKI, S.; BRAFFORD, P.; VULTUR, A.; BASU, D.; GIMOTTY, P.; VOGT, T.; HERLYN, M. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*, 2010, Vol. 141, No. 4, p. 583–594.
129 ROMANO, M.; FRANCESCO, F.; PIROZZI, G.; GRINGERI, E.; BOETTO, R.; DOMENICO, M.; ZAVAN, B.; FERRERO, G. Expression of cancer stem cell biomarkers as a tool for a correct therapeutic approach to hepatocellular carcinoma. *Oncoscience*, 2015, Vol. 2, No. 5, p. 443–456.
130 SABIN, R.; ANDERSON, R. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr*, 2011, Vol. 2, No. 7.
131 SAITO, Y.; KITAMURA, H.; HIJIKATA, A.; TOMIZAWA-MURASAWA, M.; TANAKA, S.; TAKAGI, S.; UCHIDA, N.; SUZUKI, N.; SONE, A.; NAJIMA, Y.; OZAWA, H.; WAKE, A.; TANIGUCHI, S.; SCHULTZ, L.; OHARA, O.; ISHIKAWA, F. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med*, 2010, Vol. 2, No. 17.
132 SANDOR, N.; SCHILLING-TOTH, B.; KIS, E.; FODOR, L.; MUCSANYI, F.; SAFRANY, G.; HEGYESI, H. TP53inp1 gene is implicated in early radiation response in human fibroblast cells. *Int J Mol Sci*, 2015, Vol. 16, No. 10, p. 25450–25465.
133 SCHAFER, M.; WERNER, S. The cornified envelope: a first line of defense against reactive oxygen species. *J Invest Dermatol*, 2011, Vol. 131, No. 7, p. 1409-1411.
134 SCHILDKOPF, P.; FREY, B.; MANTEL, F.; OTT, O.; WEISS, E.; SIEBER, R.; JANKO, C.; SAUER, R.; FIETKAU, R.; GRAIPL, U. Application of hyperthermia in addition to ionizing irradiation fosters necrotic cell death and HMGB1 release of colorectal tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, Vol. 139, No. 1, p. 1014–1020.
135 SESHACHARYULU, P.; BAINE, M.; SOUCHEK, J.; MENNING, M.; KAUR, S.; YAN, Y.; OULLETTE, M.; JAIN, M.; LIN, C.; BATRA, S. Biological determinants of radioresistance and their remediation in pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2017, Vol. 1868, No. 1, p. 69–92.
136 SHAHIDI, M.; MOZDARANI, H.; MUELLER, W. Radiosensitivity and repair kinetics of gamma-irradiated leukocytes from sporadic prostate cancer patients and healthy individuals assessed by alkaline comet assay. *Iran Biomed J*., 2010, Vol. 14, No. 3, p. 67–75.
137 SHARMA, K.; GOEHE, R.; BECKTA, J.; VALERIE, K.; GEWIRTZ, D. Autophagy and radiosensitization in cancer. *EXCLI J*, 2014, Vol. 13, p. 178–191.
138 SKVORSTOV, S.; DEBBAGE, P.; SKVORTSOVA, I. Proteomics of cancer stem cells. *Int J Radiat Biol*, 2014, Vol. 90, No. 8, p. 653–658.
139 SKVOTSOV, S.; DEBBAGE, P.; LUKAS, P.; SKVORTSOVA, I. Crosstalk between DNA repair and cancer stem cell (CSC) associated intracellular pathways. *Semin Cancer Biol*, 2015, Vol. 31, p. 36–42.
140 SOBOL, R.; PRASAD, R.; EVENSKI, A.; BAKER, A.; YANG, X.; HORTON, J.; WILSON, S. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, 2000, Vol. 405, No. 6788, p. 807–810.
141 SOSSOU, M.; FLOHR-BECKHAUS, C.; SCHULZ, I.; DABOUSSI, F.; EPE, B.; RADICELLA, J. APE1 overexpression in XRCC1-deficient cells complements the defective repair of oxidative single strand breaks but increases genomic instability. *Nucleic Acids Res*, 2005, Vol. 33, No. 1, p. 298–306.
142 SRIVASTAVA, M.; RAGHAVAN, S. DNA double-strand break repair inhibitors as cancer therapeutics. *Chem Biol*, 2015, Vol. 22, No. 1, p. 17–29.
143 STANKEVICIUS, V.; VASAUSKAS, G.; RYNKEVICIENE, R.; VENIUS, J.; PASUKONIENE, V.; ALEKNAVICIUS, E.; SUZIEDELIS, K. Microenvironment and dose-delivery-dependent response after exposure to ionizing radiation in human colorectal cancer cell lines. *Radiat Res*, 2017, Vol. 188, No. 3, p. 291–302.
144 STRAUME, O.; SHIMAMURA, T.; LAMPA, M.; CARRETERO, J.; OYAN, A.; JIA, D.; BORGMAN, C.; SOUCHERAY, M.; DOWNING, S.; SHORT, S.; KANG, S.; WANG, S.; CHEN, L.; COLLETT, K.; BACHMANN, I.; WONG, K.; SHAPIRO, G.; KALLAND, K.; FOLKMAN, J.; WATNICK, R.; AKSLEN, L.;

NAUMOV, G. Suppression of heat shock protein 27 induces long-term dormancy in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 2012, Vol. 109, No. 22, p. 8699–8704.
145 TAM, S.; WU, V.; LAW, H. Influence of autophagy on the efficacy of radiotherapy. *Radiat Oncol*, 2017, Vol. 12, No. 57.
146 TAO, H.; WANG, H.; DAI, M.; GU, C.; WANG, Q.; HAN, Z.; CAI, B. Targeting SHCBP1 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, Vol. 14, No. 10, p. 5645–5650.
147 THARIAT, J.; HANNOUN-LEVI, J.; MYINT, A.; VUONG, T.; GERARD, J. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013, Vol. 10, No. 1, p. 52–60.
148 VAIOPOULOS, A.; KOSTAKIS, I.; KOUTSILIERIS, M.; PAPAVASSILIOU, A. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells*, 2012, Vol. 30, No.3, p. 363–371.
149 VENERE, M.; HAMERLIK, P.; WU, Q.; RASMUSSEN, R.; SONG, L.; VASANJI, A.; TANLEY, N.; FLAVAHAN, W.; HJELMELAND, A.; BARTEK, J.; RICH, J. Therapeutic targeting of constitutive PARP activation compromises stem cell phenotype and survival of glioblastoma-initiating cells. *Cell Death Differ*, 2014, Vol. 21, No. 2, p. 258–269.
150 VERMEULEN, L.; DE SOUSA, E.; MELO, F.; HEIJDEN, M.; CAMERON, K.; JONG, J.; BOROVSKI, T.; TUYNMAN, J.; TODARO, M.; MERZ, C.; RODERMOND, H.; SPRICK, M.; KEMPER, K.; RICHEL, D.; STASSI, G.; MEDEMA, J. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*, 2010, Vol. 12, No. 5, p. 468–476.
151 VYAS, S.; CHESARONE-CATALDO, M.; TODOROVA, T.; HUANG, Y.; CHANG, P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat Commun*, 2013, Vol. 4, No. 2240.
152 VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, Vol. 12, No. 6, p. 385–392.
153 VITALE, I.; MANIC, G.; DE MARIA, R.; KROEMER, G.; GALLUZZI, L. *DNA Damage in Stem Cells*. Mol Cell, 207, Vol. 66, No. 3, p. 306–319.
154 WANG, B.; CHEN, Q.; CAO, Y.; YIN, C.; JIA, Y.; ZANG, A.; FAN, W. LGR5 Is a gastric cancer stem cell marker associated with stemness and the EMT Signature genes NANOG, NANOGP8, PRRX1, TWIST1, and BMI1. *PloS One*, 2016, Vol. 11, No. 12.
155 WANG, Q. DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World J Biol Chem*, 2015, Vol. 6, No. 3, p. 57–64.
156 WANG, S.; BAI, L.; LU, J.; LIU, L.; YANG, C. Targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) for new breast cancer therapeutics. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2013, Vol. 17, No. 3-4, p. 217-228.
157 WEISWALD, L.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical cancer models in tumor biology. Neoplasia., 2015, Vol. 17, No. 1, p, 1-15.
158 ZHAN, Q.; WANG, C.; NGAI, S. Ovarian cancer stem cells: a new target for cancer therapy. *Biomed Res Int*., 2013, Vol. 2013, p. 1–15.
159 ZHANG, B.; HORVATH, S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2005, Vol. 4, No. 17.
160 ZHANG, X.; LIU, Y.; SUN, F.; LI, H.; LEI, S.; WANG, J. p21 is responsible for ionizing radiation-induced bypass of mitosis. *Biomed Environ Sci*, 2016, Vol. 9, No. 7, p. 484–493.

PRIEDAI

1 PRIEDAS. Genų koekpresijos analizėje naudotų mikrogardelių duomenys.

Ląstelių linija	JS dozė	GEO kodas
DLD1	2 Gy	GSM1970178
		GSM1970179
		GSM1970180
	10 Gy	GSM1970181
		GSM1970182
		GSM1970183
	12 Gy	GSM349760
	5x2 Gy	GSM1970184
		GSM1970185
		GSM1970186
HCT116	2 Gy	GSM2756648
		GSM2756649
		GSM2756650
	12 Gy	GSM349751
	5x2 Gy	GSM2756651
		GSM2756652
		GSM2756653
HT29	2 Gy	GSM1970187
		GSM1970188
		GSM1970189
	10Gy	GSM1970190
		GSM1970191
		GSM1970192
	5x2 Gy	GSM1970193
		GSM1970194
		GSM1970195
RKO	12 Gy	GSM349756
SW1463	4 Gy	GSM2571862
		GSM2571863
		GSM2571864
SW48	12 Gy	GSM349761

2 PRIEDAS. Ląstelių auginamų 2D bei 3D-M modelinėse sistemose išgyvenamumas po poveikio skirtingomis JS dozėmis. Kontrolė – JS neveiktos ląstelės. Pateikiama išgyvenusių ląstelių dalis.

Linija	Sublinija	Auginimas	Kontrolė	2 Gy	6 Gy	5x2 Gy
DLD1	WT	2D	1 ± 0,11	0,71 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,3 ± 0,04
		3D-M	1 ± 0,11	0,89 ± 0,08	0,63 ± 0,17	0,62 ± 0,14
	PARP12	2D	1 ± 0,12	0,79 ± 0,03	0,18 ± 0,04	0,4 ± 0,04
		3D-M	1 ± 0,13	0,87 ± 0,11	0,69 ± 0,09	0,6 ± 0,13
	PARP13	2D	1 ± 0,12	0,78 ± 0,13	0,13 ± 0,07	0,29 ± 0,09
		3D-M	1 ± 0,15	0,79 ± 0,12	0,6 ± 0,16	0,58 ± 0,16
	PARP14	2D	1 ± 0,05	0,73 ± 0,07	0,08 ± 0,04	0,14 ± 0,05
		3D-M	1 ± 0,13	0,78 ± 0,11	0,58 ± 0,13	0,55 ± 0,11
HT29	WT	2D	1 ± 0,06	0,86 ± 0,09	0,27 ± 0,04	0,37 ± 0,03
		3D-M	1 ± 0,03	0,92 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,69 ± 0,01
	PARP12	2D	1 ± 0,03	0,84 ± 0,17	0,19 ± 0,09	0,23 ± 0,08
		3D-M	1 ± 0,16	0,78 ± 0,04	0,49 ± 0,02	0,58 ± 0,07
	PARP13	2D	1 ± 0,09	0,74 ± 0,14	0,16 ± 0,12	0,07 ± 0,14
		3D-M	1 ± 0,1	0,71 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,05
	PARP14	2D	1 ± 0,1	0,82 ± 0,06	0,19 ± 0,05	0,16 ± 0,05
		3D-M	1 ± 0,08	0,71 ± 0,02	0,59 ± 0,12	0,59 ± 0,07

