

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

на тема

„Роля на HMGB1 в епително-мезенхимния преход (EMT) и метастазирането в 2D и 3D модели на рак на млечната жлеза“

на докторант

Десислава Валериева Владимирова

за присъждане на образователно-научна степен „Доктор“ по научна специалност 4.3 Биологически науки, Молекулярна биология

Научен ръководител: **проф. д-р Ива Угринова**

**гр. София
2025 г.**

Дисертационният труд се състои от 13 раздела, включващи увод, литературен обзор, цел и задачи, материали и методи, резултати, дискусия, заключение, изводи и приноси, ограничения на изследването, бъдещи научни перспективи, списък с използвана литература, списък с научни публикации по темата на дисертационния труд и списък с участия на национални/международни конференции/конгреси. Общият обем на дисертационния труд е 156 страници, в които са включени 57 фигури, 5 таблици и 238 литературни източника.

Дисертационният труд е представен и обсъден на разширен семинар на секция „Структура и функция на хроматина“ към Института по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“, БАН, на 21.10.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе в заседателната зала на ИМБ-БАН, ул. "Акад. Г. Бончев", блок 21, ет. 2, гр. София, съгласно правилника за условията и реда за придобиване на научни и академични длъжности в ИМБ-БАН, пред Научното жури в състав:

Членове:

Проф. д-р Таня Топузова
Проф. д-р Румяна Цонева
Проф. д-р Ирина Цанева
Чл. кор. Евдокия Пашева
Доц. д-р Мария Петрова

Резервни членове:

Чл.кор. Нина Атанасова
Доц. д-р Анастас Господинов

Материалите по защита на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИМБ-БАН, ул. "Акад. Г. Бончев", блок 21, ет. 4, гр. София.

Забележка: Номерацията на фигурите в автореферата не съответства с номерацията на фигурите в дисертационния труд.

Съдържание

1. Въведение	5
2. Цели и задачи	7
3. Материяли и методи	8
3.1 Материали	8
3.2 Методи	8
4. Резултати	9
4.1 Влияние на HMGB1 и HMGB1ΔC върху клетъчната подвижност при различни молекулярни подтипове на рак на млечната жлеза	9
4.2. HMGB1 и HMGB1ΔC индуцират експресия на EMT маркери при MDA-MB-231	13
4.3. Сравнителен анализ на базовата експресия на HMGB1, RAGE и NF-κB при различни молекулярни подтипове на рак на млечната жлеза	16
4.4. Оптимизация на 3D сфероиден модел за изследване на клетъчна инвазия	17
4.5. HMGB1 и HMGB1ΔC стимулират инвазия на 3D туморни сфероиди в колагенов гел	19
4.6. Заглушаване на RAGE рецептора потвърждава различен механизъм на действие на HMGB1ΔC	21
4.7. HMGB1ΔC индуцира ядрена акумулация на фосфорилиран NF-κB (p65)	24
4.8. Определяне на цитотоксичността на метформин в 2D и 3D клетъчни модели	25
4.9. Влияние на метформин върху клетъчната подвижност, EMT и инвазия, индуцирани от HMGB1 и HMGB1ΔC	27
4.10. Метформин потиска HMGB1-зависимата активация на NF-κB, но няма ефект върху HMGB1ΔC	34
4.11. Метформин нарушава взаимодействието между HMGB1 и RAGE	35
5. Дискусия	36
6. Заключение	38
7. Изводи и приноси	38
8. Използвана литература	39
СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	41

СПИСЪК С УЧАСТИЯ НА МЕЖДУНАРОДНИ И НАЦИОНАЛНИ КОНФЕРЕНЦИИ.....	42
---	-----------

1. Въведение

Ракът на млечната жлеза е най-често срещаното злокачествено заболяване сред жените в световен мащаб и водеща причина за смъртност, свързана с онкологични заболявания. През 2022 г. са регистрирани над 2,3 милиона нови случая и приблизително 685 000 смъртни случая [1]. Въпреки значителния напредък в ранната диагностика и прилагането на съвременни терапии, метастатичната форма на заболяването остава основно клинично предизвикателство, тъй като над 90% от смъртните случаи се дължат на разпространението на тумора, а към момента не съществува напълно ефективна таргетна терапия за метастатичната форма [2].

Ключов процес в метастазирането е епително-мезенхимният преход (ЕМТ). Това е обратим механизъм, при който епителните клетки придобиват мезенхимни характеристики, губят клетъчната адхезия и развиват повишена миграционна и инвазивна способност. ЕМТ участва не само в иницирането на метастази, но и в развитието на лекарствена резистентност, избягването на имунен надзор и ремоделирането на туморната микросреда [3], [4], [5].

Сред факторите, стимулиращи ЕМТ, съществена роля играе високоподвижният белтък от група В1 (HMGB1). Макар че първоначално той бе описан като ядрен белтък, участващ в ДНК репликация, транскрипция и поправка на ДНК повреди, с годините се установи, че HMGB1 проявява и извънклетъчни функции, свързани с възпаление и клетъчна комуникация [6]. При клетъчен стрес или некроза той се освобождава в извънклетъчното пространство, където действа като молекула алармин за клетъчно увреждане (DAMP), взаимодействайки с рецептори като RAGE и TLR2/4 [7], [8], [9]. Това води до активиране на сигнални каскади, включително NF- κ B, и до експресия на гени, свързани с ЕМТ, възпаление и деградация на извънклетъчната матрица [10]. По този начин HMGB1 представлява ключов свързващ фактор между възпалението и метастатичната прогресия.

HMGB1 съдържа два ДНК-свързващи домена (Box A и Box B) и неструктуриран C-терминален киселинен участък, който регулира тяхната достъпност чрез вътремолекулни взаимодействия [6], [11]. Тази C-терминална опашка играе ключова модулаторска роля и за белтък-белтъчните взаимодействия между HMGB1 и неговите рецептори, като промените в нея, включително протеолитично скъсяване, могат съществено да повлияят върху извънклетъчната функция на HMGB1. Въпреки това, наличните данни относно ролята ѝ във възпалителните и про-метастатични процеси остават противоречиви и непълно разкрити [12], [13], [14], [15].

Именно поради това, по-задълбоченото изучаване на структурно-функционалните механизми, чрез които HMGB1 взаимодейства със своите рецептори, е от съществено значение за разработването на нови насочени терапии. В този контекст 3D клетъчните модели, които възпроизвеждат по-достоверно пространствената организация и сигналната

динамика на туморната микросреда, представляват ценен инструмент за изследване на ЕМТ и инвазивните процеси [11], [16]

В допълнение, от клинична гледна точка HMGB1 се очертава като привлекателна, но сложна терапевтична мишена, тъй като неговото директно инхибиране е затруднено поради високата му структурна пластичност и мултифункционалност. Наскоро бе показано, че метформин, който по принцип има широко приложение при лечението на захарен диабет тип 2, взаимодейства и се захваща директно за С-терминалната опашка на HMGB1 [17], като по този начин потенциално може да блокира рецепторно-медираната сигнализация и индуцирания от HMGB1 ЕМТ. Въпреки това, ефектът на метформин върху HMGB1 и неговите структурно модифицирани форми, както и неговото въздействие върху инвазивното поведение на туморните клетки остават недостатъчно изяснени.

Тези наблюдения очертават съществена изследователска празнина и формират мотивацията на настоящата работа, която цели да изясни ролята на С-терминалната опашка на HMGB1 в регулирането на ЕМТ и инвазивността при рак на млечната жлеза, да оцени ефекта от нейното премахване върху тези процеси, както и оцени възможността метформин да модулира тези процеси.

2. Цели и задачи

Въз основа на анализа на наличната литература, разгледаните механизми на HMGB1-зависимия ЕМТ и ролята на С-терминалната опашка, както и потенциалната фармакологична модулация чрез метформин, бяха формулирани следните цели и задачи:

Цел 1: Да се сравни ефектът на HMGB1 и скъсения вариант без С-терминална опашка (HMGB1ΔC) върху активирането на ЕМТ, клетъчна миграция и инвазия в различни подтипове на рак на млечната жлеза

Задачи, свързани с Цел 1:

1. Да се оцени ефектът на рекомбинантни HMGB1 и HMGB1ΔC върху клетъчната миграция чрез „wound healing“ тест
2. Да се изследва влиянието на рекомбинантни HMGB1 и HMGB1ΔC върху инвазивността в 3D сфероиден модел
3. Да се анализира експресията на ЕМТ маркери след третиране с рекомбинантни HMGB1 и HMGB1ΔC
4. Да се установи дали наблюдаваните ефекти са зависими от рецептора RAGE чрез неговото заглушаване
5. Да се оцени фосфорилирането на NF-κB като индикатор за активация на сигналния път

Цел 2: Да се оцени потенциалът на метформин като терапевтичен модулатор на HMGB1-зависимия ЕМТ

Задачи, свързани с Цел 2:

1. Да се определят суб-инхибиторни концентрации на метформин чрез МТТ анализ в 2D и 3D модели
2. Да се изследва ефектът на метформин самостоятелно и в комбинация с HMGB1 върху клетъчната миграция и инвазия
3. Да се анализира ефектът на метформин самостоятелно и в комбинация с HMGB1 върху експресията на ЕМТ маркери
4. Да се анализира ефектът на метформин самостоятелно и в комбинация с HMGB1 върху фосфорилирането на NF-κB
5. Да се анализира ефектът на метформин върху взаимодействието на HMGB1 с RAGE

3. Материяли и методи

3.1 Материали

Клетъчно култивиране

В изследването бяха използвани човешки клетъчни линии от рак на млечната жлеза: MDA-MB-231 (тройно-негативна), MCF-7 (ER+) и SK-BR-3 (HER2+), предоставени от ATCC. Клетките бяха култивирани в DMEM с висока глюкоза, 10% FBS, антибиотици и антимикотици, като за MCF-7 се добавяше 10 µg/ml рекомбинантен човешки инсулин, при стандартни условия (37°C, 5% CO₂). За 3D сфероидни модели се използваха Ultra-Low Attachment U-bottom плаки и метилцелулоза.

Изолиране и пречистване на белтъци

Рекомбинантните HMGB1 и HMGB1ΔC бяха експресирани в рЕТ-28a(+) и пречистени чрез His-tag афинитетна хроматография и диализа. За ко-имунопреципитации на HMGB1, HMGB1ΔC и RAGE се използваха Pierce Protein A/G магнитни перли.

Имунофлуоресцентен анализ и Western blot

Експресията на EMT маркери и NF-κB се оценяваше с антитела срещу E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, ZO-1, p65 NF-κB, фосфорилиран p65 NF-κB, HMGB1, RAGE, β-actin и PCNA, с подходящи HRP- или флуорофорно конюгирани вторични антитела (Alexa Fluor 488). Блокирането на неспецифично свързване се осигуряваше чрез албумин от говежди серум (BSA). Стъклата за имунофлуоресцентния анализ се монтираха с Fluoromount-G, съдържащ DAPI.

Реагенти за оценка на жизнеспособност

За оценка на жизнеспособността на сфероиди се използваха Calcein-AM и Propidium iodide (PI) в комбинация с Hank's Balanced Salt Solution.

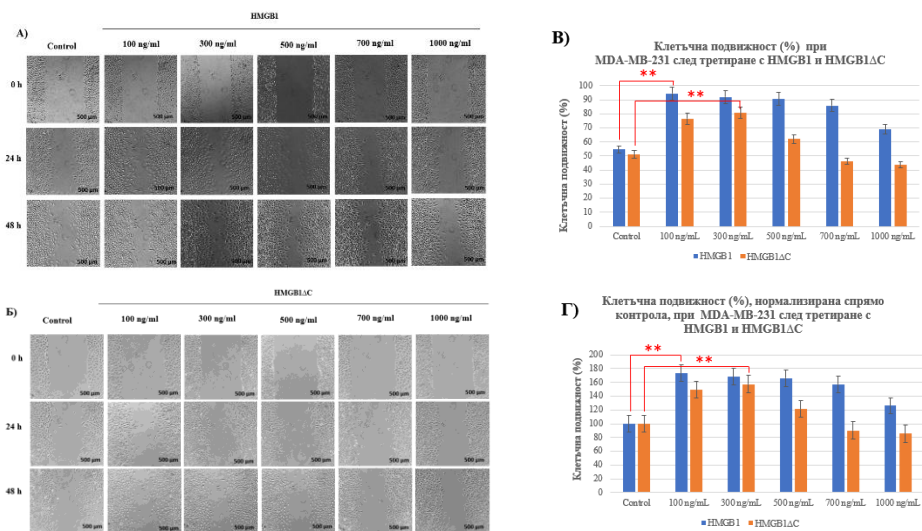
3.2 Методи

1. Експресия и пречистване на рекомбинантни белтъци
2. Клетъчно култивиране
3. Анализ на клетъчната миграция чрез „wound healing assay“
4. Формиране на 3D туморни сфероиди с помощта на метилцелулоза
5. Оценка на жизнеспособността на 3D туморни сфероидни модели
6. Оценка на инвазивния потенциал на 3D туморни сфероиди в колагенов гел
7. Анализ на експресия на белтъци чрез SDS-PAGE и Western blot
8. Субклетъчно фракционироване
9. Заглушаване на експресията на рецептора RAGE със специфична esiRNA
10. Имунофлуоресцентен анализ
11. МТТ анализ за оценка на клетъчната жизнеспособност в 2D и 3D култури
12. Ко-имунопреципитация (Co-IP)

4. Резултати

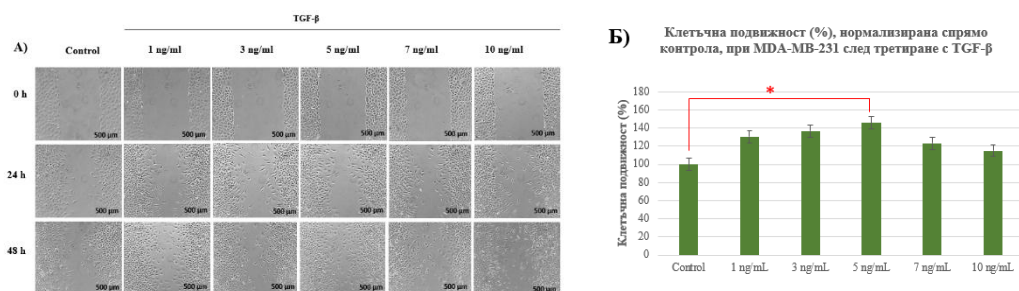
4.1 Влияние на HMGB1 и HMGB1ΔC върху клетъчната подвижност при различни молекулярни подтипове на рак на млечната жлеза

Клетъчната подвижност бе оценена чрез wound healing анализ при трите човешки клетъчни линии на рак на млечната жлеза – MDA-MB-231 (тройно-негативна), MCF-7 (ER⁺) и SK-BR-3 (HER2⁺). Третирането с рекомбинантни HMGB1 и HMGB1ΔC (100–1000 ng/mL), както и с TGF-β (1–10 ng/mL, положителен контрол), разкри изразен субтипово-специфичен ефект. Единствено MDA-MB-231 демонстрираха значима миграция в рамките на 48 часа след третиране (Фигура 1 и Фигура 2), докато MCF-7 (Фигура 3 и Фигура 4) и SK-BR-3 (Фигура 5 и Фигура 6) не показаха статистически съществено затваряне на раната спрямо контролните проби.



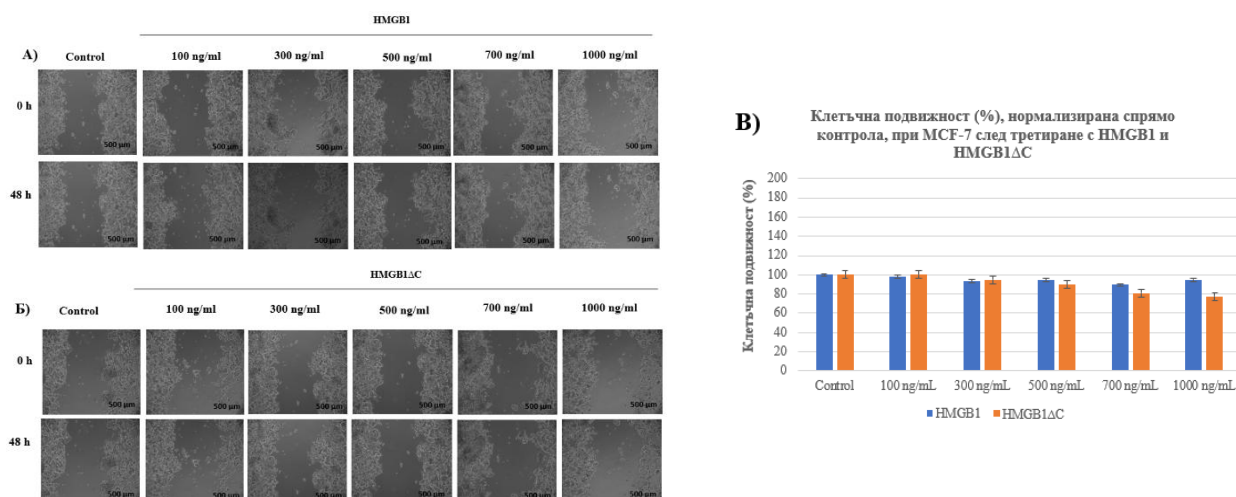
Фигура 1. Влияние на HMGB1 и HMGB1ΔC върху клетъчната миграция на MDA-MB-231, оценена чрез wound healing assay.

(А) Представителни изображения на MDA-MB-231 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1. Скала: 500 μm. (Б) Представителни изображения на MDA-MB-231 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1ΔC. Скала: 500 μm. (В) Графично представяне на процента на затваряне на раната след 48 часа на MDA-MB-231 клетки след третиране с HMGB1 и HMGB1ΔC, изчислен спрямо началната ширина на раната (0 ч). (Г) Нормализирани стойности на процентовото затваряне на раната, приети като 100% за нетретираните контролни клетки. Всички резултати са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), n = 3. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с ** (p < 0,01).



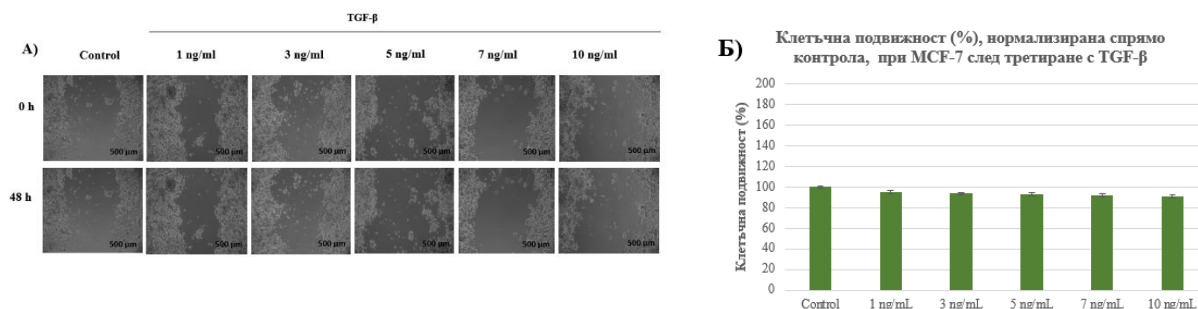
Фигура 2. Влияние на TGF- β върху клетъчната миграция на MDA-MB-231, оценена чрез wound healing assay.

(А) Представителни изображения на MDA-MB-231 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на TGF- β . Скала: 500 μ m. (Б) Нормализирани стойности на процентово затваряне на раната, приети като 100% за нетретираните контролни клетки. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с * ($p < 0,05$).



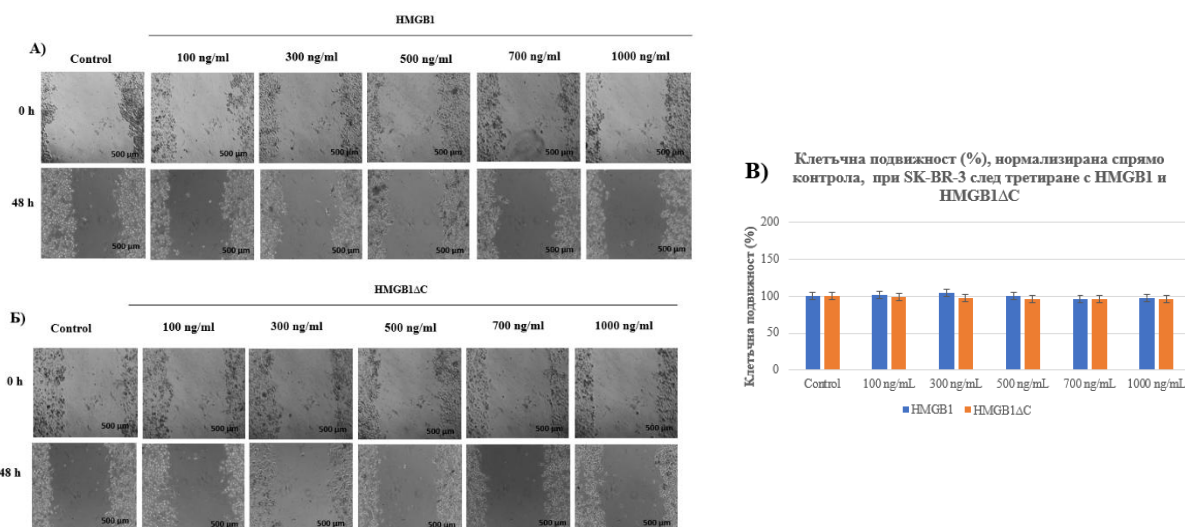
Фигура 3. Влияние на HMGB1 и HMGB1 Δ C върху клетъчната миграция на MCF-7, оценена чрез wound healing assay.

(А) Представителни изображения на MCF-7 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1. Скала: 500 μ m. (Б) Представителни изображения на MCF-7 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1 Δ C. Скала: 500 μ m. (В) Нормализирани стойности на процентово затваряне на раната, приети като 100% за нетретираните контролни клетки. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ.



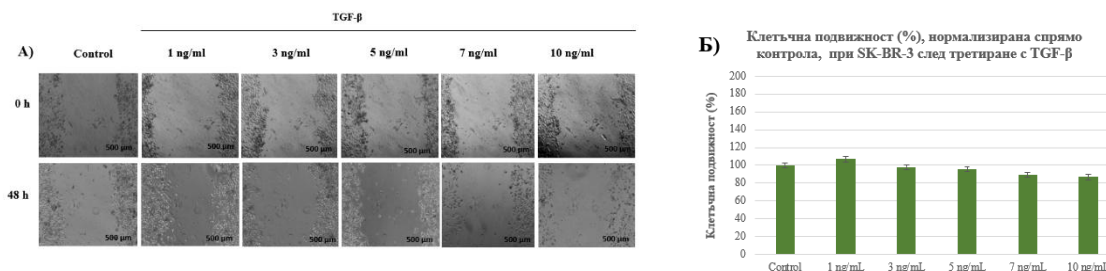
Фигура 4. Влияние на TGF- β върху клетъчната миграция на MCF-7, оценена чрез wound healing assay.

(А) Представителни изображения на MCF-7 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на TGF- β . Скала: 500 μ m. (Б) Нормализирани стойности на процентното затваряне на раната, приети като 100% за нетретираните контролни клетки. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ.



Фигура 5. Влияние на HMGB1 и HMGB1 Δ C върху клетъчната миграция на SK-BR-3, оценена чрез wound healing assay.

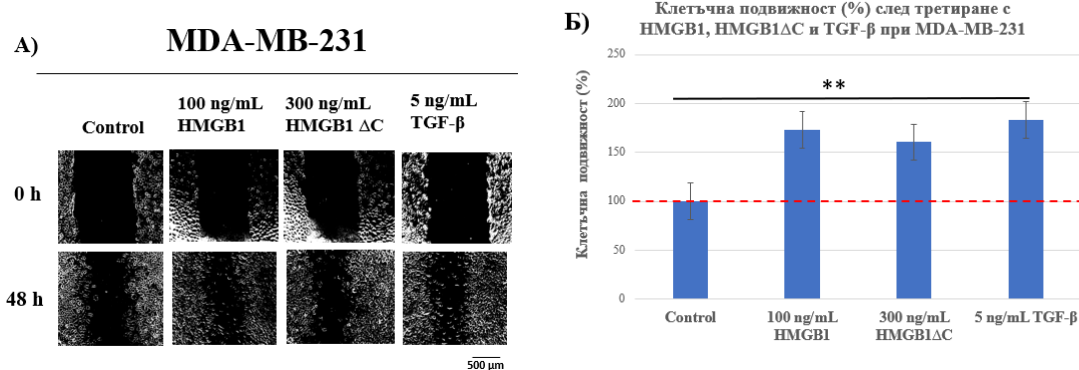
(А) Представителни изображения на SK-BR-3 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1. Скала: 500 μ m. (Б) Представителни изображения на SK-BR-3 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1 Δ C. Скала: 500 μ m. (В) Нормализирани стойности на процентното затваряне на раната, приети като 100% за нетретираните контролни клетки. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ.



Фигура 6. Влияние на TGF- β върху клетъчната миграция на SK-BR-3, оценена чрез wound healing assay.

(А) Представителни изображения на SK-BR-3 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране с различни концентрации на TGF- β . Скала: 500 μ m. (Б) Нормализирани стойности на процентното затваряне на раната, приети като 100% за нетретираните контролни клетки. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ.

Максимален ефект на клетъчната подвижност при MDA-MB-231 бе наблюдаван при 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1 Δ C и 5 ng/mL TGF- β (Фигура 7). Тези резултати предполагат, че клетките от тройно-негативния подтип са по-възприемчиви към HMGB1-медиирани сигнали, което може да се дължи на различия в базовата експресия на съответните рецептори и сигнални компоненти.

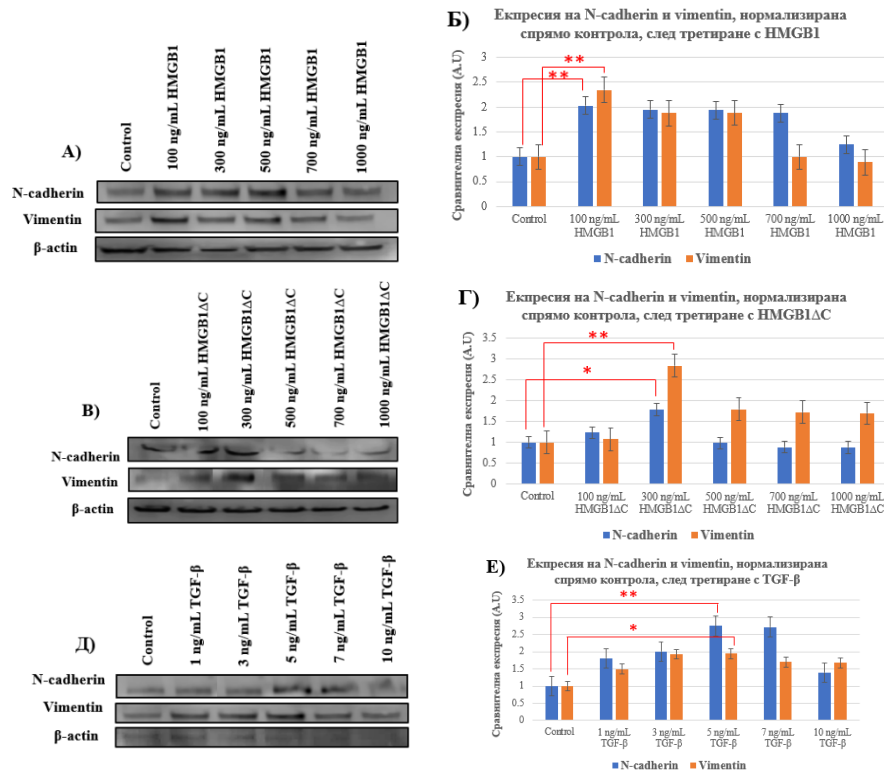


Фигура 7. Ефектът на HMGB1, HMGB1 Δ C и TGF- β върху клетъчната подвижност при MDA-MB-231.

(А) Представителни изображения за клетъчна подвижност от wound healing тест, заснети на 0 и 48-ми час след третиране със 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1 Δ C и 5 ng/mL TGF- β . (Б) Количествена оценка на клетъчната подвижност, нормализирана спрямо контролата, която е приета като 100% затваряне на раната. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с ** ($p < 0,01$).

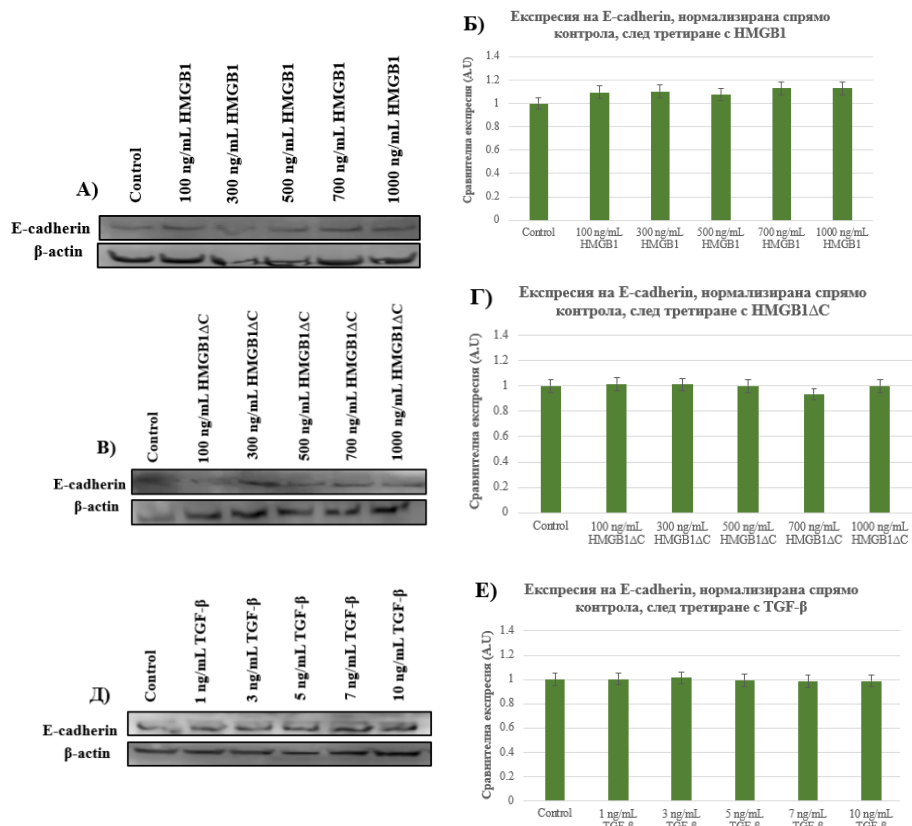
4.2. HMGB1 и HMGB1ΔC индуцират експресия на ЕМТ маркери при MDA-MB-231

За да се потвърди, че наблюдаваната клетъчна подвижност е свързана с активиране на ЕМТ, бе анализирана експресията на характерни ЕМТ маркери за всяка клетъчна линия. Изследвани бяха N-cadherin и Vimentin при MDA-MB-231 (Фигура 8), E-cadherin при MCF-7 (Фигура 9) и ZO-1 при SK-BR-3 (Фигура 10) чрез Western blot анализ.



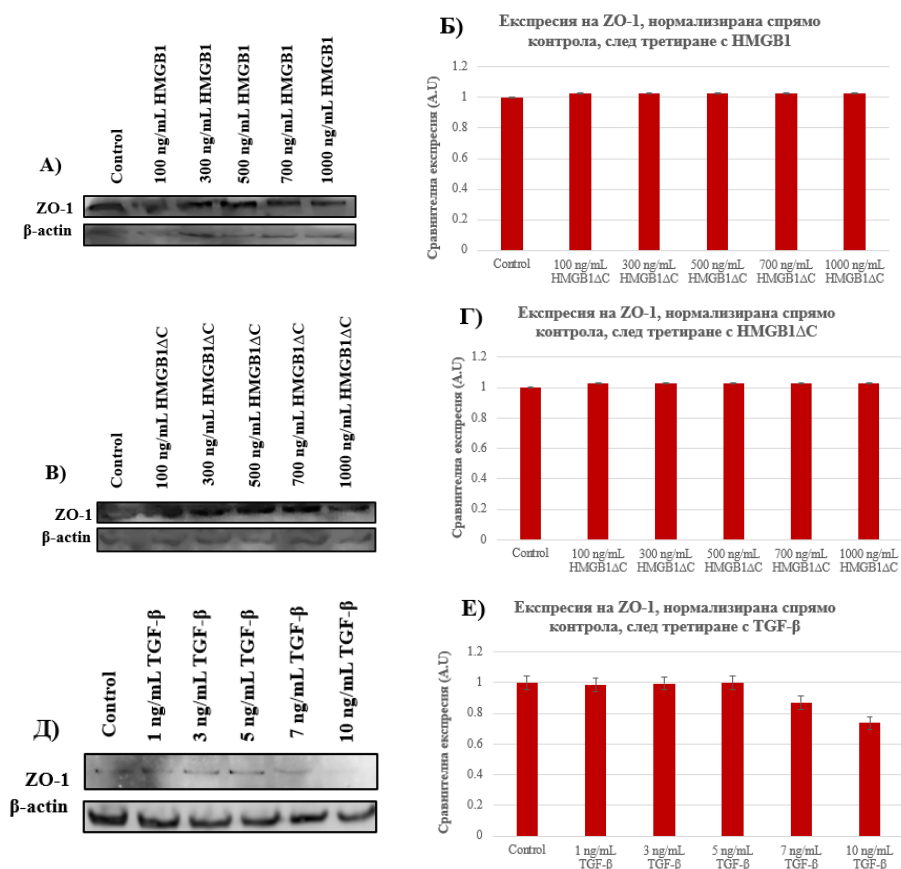
Фигура 8. Анализ на експресията на ЕМТ-маркери в MDA-MB-231 след третиране с HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β.

(А) Представителни Western blot изображения, показващи промяната в нивата на експресия на N-cadherin и Vimentin в MDA-MB-231 при третиране с HMGB1; (Б) Нормализирани стойности на експресия, представени като fold change спрямо контролната (нетретирана) група, при която нивото на експресия на белтъците е прието за 1; (В) Western blot изображения при третиране с HMGB1ΔC; (Г) Нормализирани стойности при HMGB1ΔC; (Д) Western blot изображения при третиране с TGF-β; (Е) Нормализирани стойности при TGF-β. Всички резултати са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), n = 3. Дензометричният анализ на експресията на белтъците е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с * p < 0,05; ** p < 0,01. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U.).



Фигура 9. Анализ на експресията на ЕМТ-маркери в MCF-7 след третиране с HMGB1, HMGB1 Δ C и TGF- β .

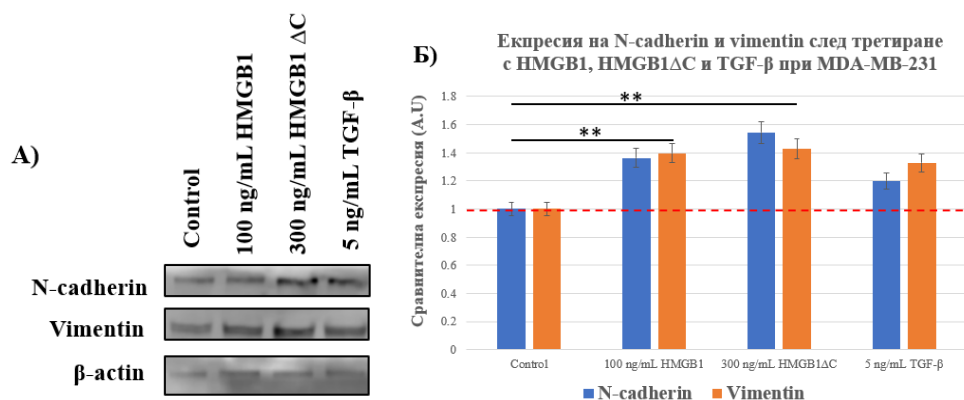
(А) Представителни Western blot изображения, показващи нивата на експресия на E-cadherin в MCF-7 при третиране с HMGB1; (Б) Нормализирани стойности на експресия, представени като fold change спрямо контролната (нетретирана) група, при която нивото на експресия на белтъците е прието за 1; (В) Western blot изображения при третиране с HMGB1 Δ C; (Г) Нормализирани стойности при HMGB1 Δ C; (Д) Western blot изображения при третиране с TGF- β ; (Е) Нормализирани стойности при TGF- β . Дензометричният анализ на експресията на белтъците е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U).



Фигура 10. Анализ на експресията на EMT-маркери в SK-BR-3 след третиране с HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β.

(A) Представителни Western blot изображения, показващи нивата на експресия на ZO-1 в SK-BR-3 при третиране с HMGB1; (Б) Нормализирани стойности на експресия, представени като fold change спрямо контролната (нетретирана) група, приета за 1; (В) Western blot изображения при третиране с HMGB1ΔC; (Г) Нормализирани стойности при HMGB1ΔC; (Д) Western blot изображения при третиране с TGF-β; (Е) Нормализирани стойности при TGF-β. Дензометричният анализ на експресията на белтъците е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U.).

При MDA-MB-231 се установи ясно повишаване на N-cadherin и Vimentin след третиране със 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1ΔC и 5 ng/mL TGF-β (Фигура 11), докато при MCF-7 (E-cadherin) и SK-BR-3 (ZO-1) не се установяват промени. Тези резултати корелират с наблюдаваната клетъчна подвижност.

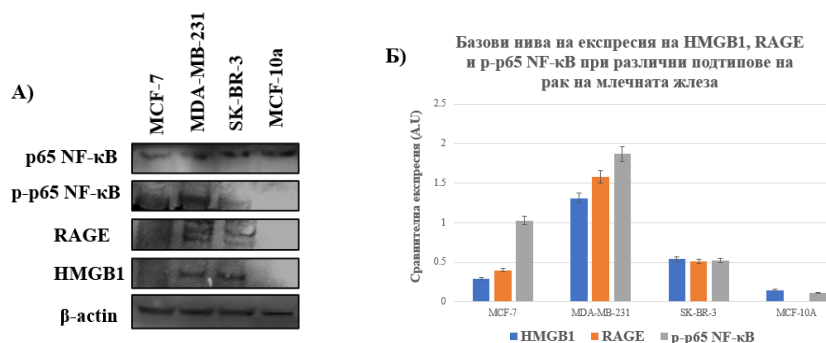


Фигура 11. Анализ на експресията на EMT-маркери в MDA-MB-231 след третиране с HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β.

(А) Представителни Western blot изображения, показващи промяната в нивата на експресия на N-cadherin и Vimentin в MDA-MB-231 при третиране със 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1ΔC и 5 ng/mL TGF-β; (Б) Околичествяване на експресията на белтъците, базирана на денситометричен анализ на Western blot сигналите от три независими експеримента ($n = 3$) посредством софтуера ImageJ. Стойностите са представени като средна $\pm$ стандартно отклонение и са нормализирани стойности, представени като fold change спрямо контролната (нетретирана) група, при която нивото на експресия на белтъците е прието за 1. Денситометричният анализ на експресията на белтъците е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с ** $p < 0,01$. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U).

4.3. Сравнителен анализ на базовата експресия на HMGB1, RAGE и NF-κB при различни молекулярни подтипове на рак на млечната жлеза

С цел да се изясни защо единствено MDA-MB-231 демонстрира чувствителност към рекомбинантните белтъци и дали това се дължи на ендегенни особености в компонентите на EMT процеса, бяха анализирани базовите нива на HMGB1, RAGE, p65 NF-κB и фосфорилиран p65 NF-κB в MDA-MB-231, MCF-7, SK-BR-3, както и в нетуморогенната епителна линия MCF-10A (използвана като негативен контрол). Резултатите показаха значително по-висока експресия на всички изследвани белтъци в MDA-MB-231 в сравнение с другите линии (Фигура 12), което вероятно обяснява повишената чувствителност на тази клетъчна линия към HMGB1-медирирани сигнали. Поради тази причина, всички последващи експериментални проучвания бяха фокусирани единствено върху MDA-MB-231.

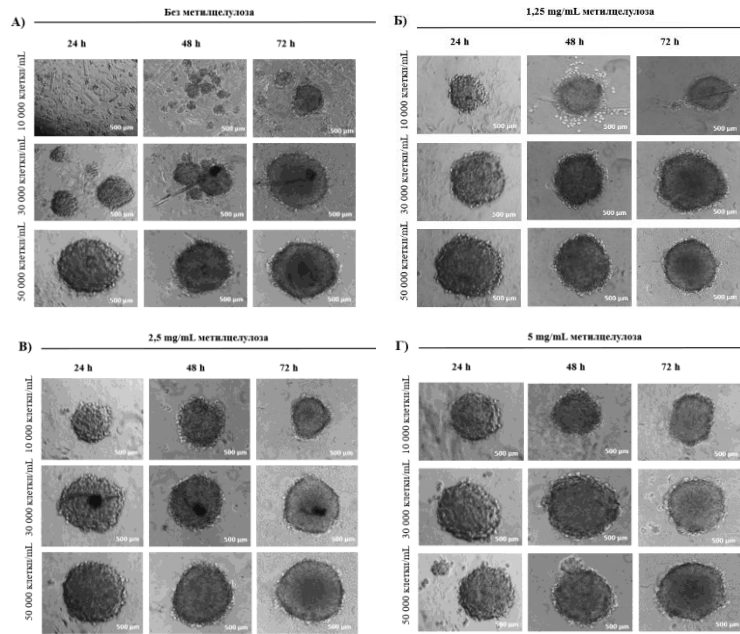


Фигура 12. Базова експресия на p65 NF-κB, phospho-p65 NF-κB, RAGE и HMGB1 в клетъчни линии на рак на млечната жлеза и нормален епител.

(А) Представителни изображения от Western blot анализ, извършен върху общо белтъчно извличение от четири клетъчни линии: MCF10A, MCF-7, MDA-MB-231 и SK-BR-3. (Б) Количествен анализ на относителната експресия на RAGE, HMGB1 и фосфорилиран p65 NF-κB спрямо тотален p65 NF-κB, нормализирани спрямо β-actin, представен графично като средна стойност ± SD от три независими експеримента (n = 3). Денситричният анализ на експресията на белтъците е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U.).

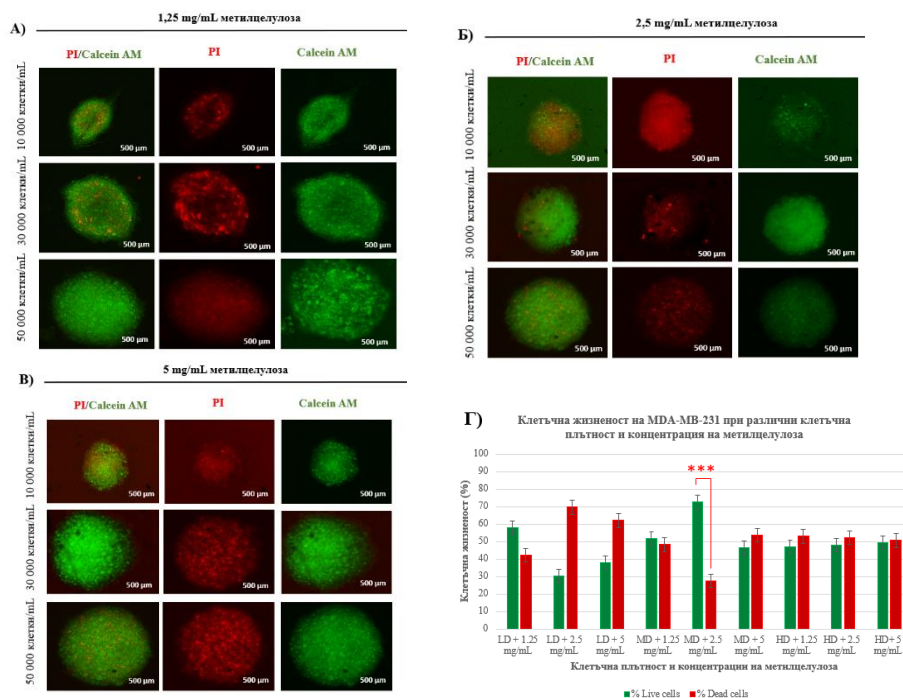
4.4. Оптимизация на 3D сфероиден модел за изследване на клетъчна инвазия

С цел разработване на надежден 3D модел за оценка на инвазивния потенциал на клетките, бяха формирани сфероиди от MDA-MB-231 чрез добавяне на метилцелулоза в различни концентрации (1,25–5 mg/mL) и при варираща клетъчна плътност (10 000, 30 000 и 50 000 клетки/mL) (Фигура 13). Анализът на морфологията и жизнеспособността на образуваните сфероиди показва, че най-компактни и добре оформени сфероиди с оптимално съотношение между живи и мъртви клетки се получават при 30 000 клетки/mL и 2,5 mg/mL метилцелулоза. Това условие беше възприето като оптимално и използвано във всички последващи експерименти (Фигура 14).



Фигура 13. Влияние на концентрацията на метилцелулоза и клетъчната плътност върху образуването на сфероиди от MDA-MB-231.

Образуването на триизмерни клетъчни сфероиди е представено при различни начални клетъчни плътности (10 000, 30 000 и 50 000 клетки/mL) и при следните условия: (А) Клетки, култивирани без добавяне на метилцелулоза; (Б) При добавяне на 1,25 mg/mL метилцелулоза; (В) При 2,5 mg/mL метилцелулоза; (Г) При 5 mg/mL метилцелулоза. Снимките са заснети с инвертен микроскоп AxioVert 200M (Zeiss), при увеличение с обектив 10×. Скала: 500 µm. Показаните изображения са представителни за три независимо проведени експеримента.

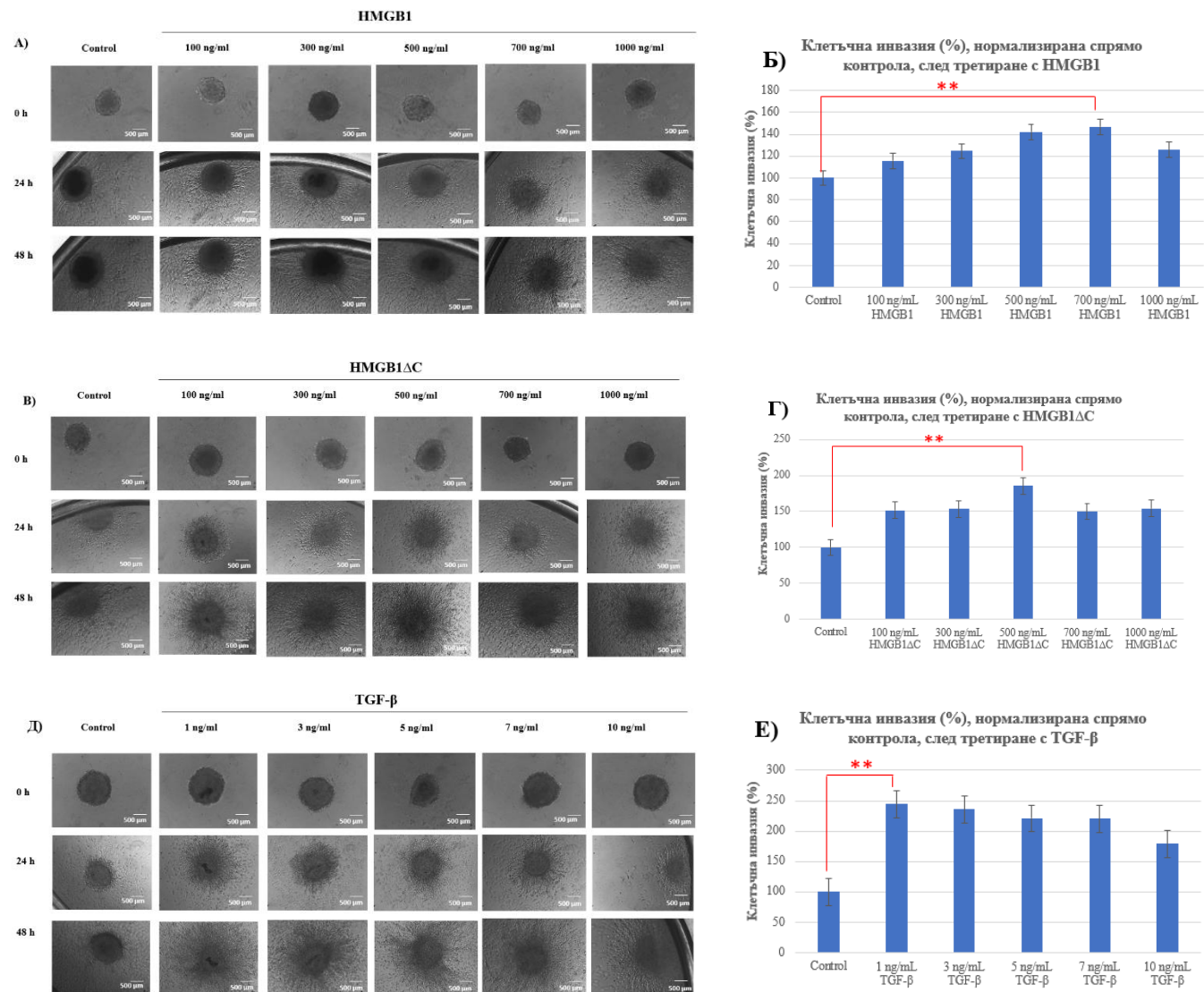


Фигура 14. Жизнеспособност на клетките в сфероиди, формирани при различни концентрации на метилцелулоза и начална клетъчна плътност.

Жизнеспособността на клетките е оценена след 72 часа култивиране чрез двойно флуоресцентно оцветяване – живите клетки са оцветени с Calcein-AM (зелено), а некротизиралите – с пропидиев йодид (червено). Изображенията са заснети с инвертен флуоресцентен микроскоп AxioVert 200M (Zeiss), с обектив 10 $\times$ и използване на подходящи филтри за зеления и червения спектър. Скала: 500 μ m. (A) Ефект на 1,25 mg/mL метилцелулоза върху жизнеспособността на клетките при различни клетъчни плътности; (Б) Ефект на 2,5 mg/mL метилцелулоза; (В) Ефект на 5 mg/mL метилцелулоза; (Г) Количествен анализ на съотношението живи/мъртви клетки, представен графично. Данните са обобщени от три независимо проведени експеримента. Количественият анализ е извършен чрез ImageJ, като са използвани три сфероида за всяко условие. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. LD: low- density (10 000 клетки/mL); MD: mid-density (30 000 клетки/mL); HD: high-density (50 000 клетки/mL). Стойности със статистическа значимост са означени с *** ($p < 0,001$).

4.5. HMGB1 и HMGB1 Δ C стимулират инвазия на 3D туморни сфероиди в колагенов гел

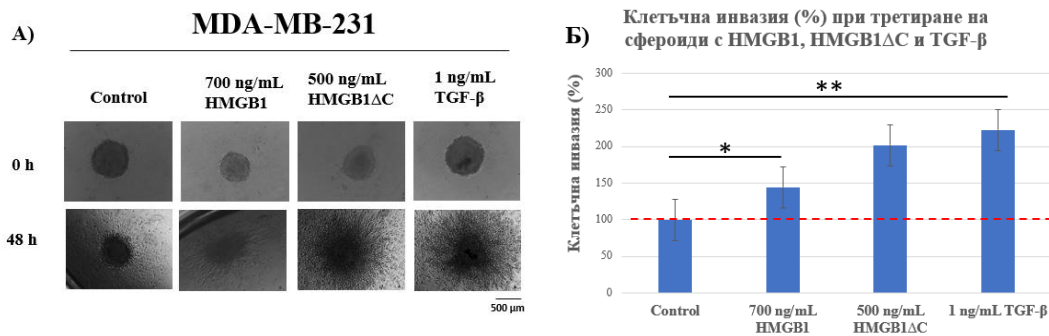
Оптимизираните сфероиди от MDA-MB-231 бяха инкубирани в колагенов матрикс тип I (2,5 mg/mL) с цел моделиране на триизмерна туморна микросреда. След полимеризация на гела, сфероидите бяха третираны с HMGB1, HMGB1 Δ C и TGF- β при същите концентрации, използвани в двуизмерния „wound healing” модел (Фигура 15).



Фигура 15. Влияние на HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β върху клетъчната инвазия на MDA-MB-231, оценена чрез тест за инвазия на сфероиди в матрикс от колаген тип 1.

(А) Представителни изображения на MDA-MB-231 сфероиди преди третиране (0 ч), 24 и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1. Скала: 500 μm. (Б) Нормализирани стойности на инвазията, приети като 100% за нетретираните контролни сфероиди. (В) Представителни изображения на MDA-MB-231 сфероиди преди третиране (0 ч), 24 и 48 часа след третиране с различни концентрации на HMGB1ΔC. Скала: 500 μm. (Г) Нормализирани стойности на инвазията, приети като 100% за нетретираните контролни сфероиди. (Д) Представителни изображения на MDA-MB-231 сфероиди преди третиране (0 ч), 24 и 48 часа след третиране с различни концентрации на TGF-β. Скала: 500 μm. (Е) Нормализирани стойности на инвазията, приети като 100% за нетретираните контролни сфероиди. Всички резултати са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), n = 3. Измерванията на диаметрите на сфероидите и изчисляването на процента инвазия са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с ** (p < 0,01).

Резултатите показаха, че и двете форми на HMGB1 индуцират клетъчна инвазия от сфероидите в околния колагенов матрикс, като HMGB1ΔC прояви по-силен проинвазивен ефект при по-ниски концентрации в сравнение с пълноверижния HMGB1. Най-изразена инвазия се наблюдава при третиране с 500 ng/mL HMGB1ΔC и 1 ng/mL TGF-β, последвани от 700 ng/mL HMGB1 (Фигура 16).

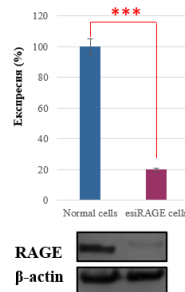


Фигура 16. Ефектът на HMGB1, HMGB1ΔC и TGF-β върху клетъчната инвазия при MDA-MB-231.

(А) Представителни изображения за клетъчна инвазия, знасети на 0 и 48-ми час след третиране със 700 ng/mL HMGB1, 500 ng/mL HMGB1ΔC и 1 ng/mL TGF-β. (Б) Количествена оценка на клетъчната инвазия, нормализирана спрямо контролата, която е приета като 100% инвазия. Измерванията и изчисляването на процента на инвазия са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с * ($p < 0,05$) и ** ($p < 0,01$).

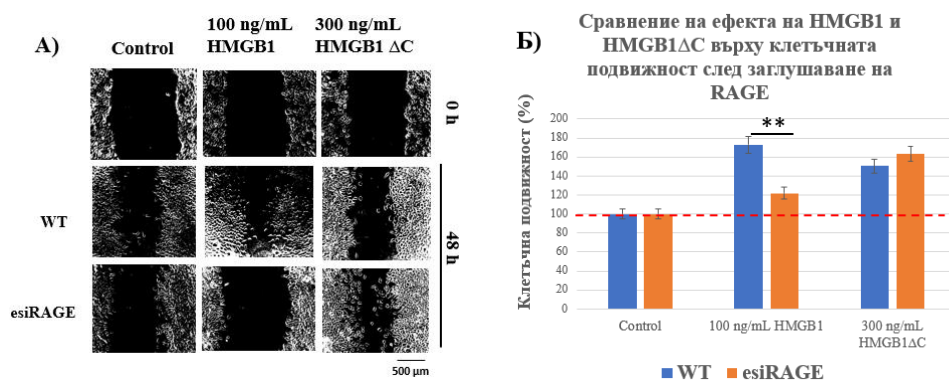
4.6. Заглушаване на RAGE рецептора потвърждава различен механизъм на действие на HMGB1ΔC

Тъй като HMGB1 обичайно индуцира EMT чрез взаимодействие с RAGE рецептора, беше изследвано дали скъсеният вариант HMGB1ΔC използва същия механизъм. За тази цел експресията на RAGE беше ефективно заглушена посредством специфични esiRNA, постигайки около 80% намаляване на белтъчното ниво (Фигура 17). След това бяха проведени повторни анализи за клетъчна подвижност (wound healing assay), EMT и 3D инвазия, като се използваха оптималните концентрации на HMGB1 и HMGB1ΔC, показали най-силни ефекти в предходните експерименти — 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC за клетъчна подвижност и EMT, както и 700 ng/mL HMGB1 и 500 ng/mL HMGB1ΔC за инвазивния анализ. При заглушаване на RAGE се наблюдава значително потискане на клетъчната подвижност (Фигура 18), EMT (Фигура 19) и инвазия (Фигура 20), индуцирани от HMGB1, докато HMGB1ΔC запазва своя проинвазивен и EMT-индуциращ ефект. Тези данни показват, че HMGB1ΔC може да активира EMT чрез алтернативни рецепторни пътища, независими от RAGE, което подчертава различния му механизъм на действие спрямо пълноверижния белтък.



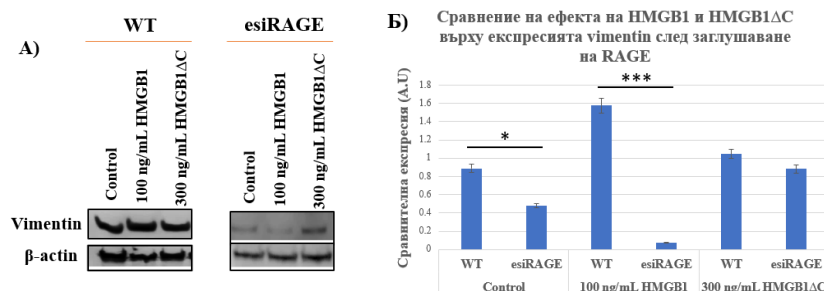
Фигура 17. Заглушаване на рецептора RAGE

Представителни изображения от Western blot анализ на експресията на RAGE в клетъчни лизати на MDA-MB-231 със и без третиране с esiRAGE, и количествен анализ на относителната експресия на RAGE, нормализирана спрямо β -actin, представен като средна стойност $\pm$ SD от три независими експеримента ($n = 3$). Статистическият анализ е извършен чрез ImageJ и unpaired t-test. Статистически значимите разлики между групите са означени с *** $p < 0,001$.



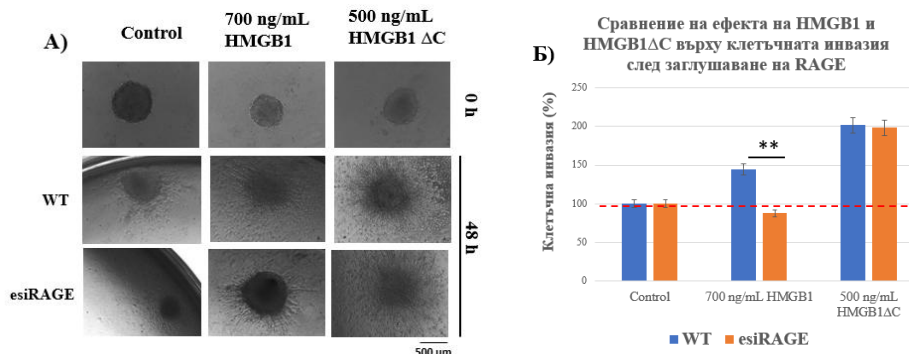
Фигура 18. Разлика в клетъчната подвижност при MDA-MB-231 със и без заглушен RAGE рецептор.

(A) Представителни изображения на MDA-MB-231 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране със 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC при клетки със (esiRAGE) и без (WT) заглушен рецептор RAGE. (Б) Количествен анализ на клетъчната подвижност, нормализирана спрямо контролата, приета за 100% клетъчна подвижност. Всички резултати са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с ** ($p < 0,01$).



Фигура 19. Ефект от заглушаването на RAGE върху експресията на Vimentin

(A) Представителни изображения от Western blot на експресията на Vimentin при MDA-MB-231 48 часа след третиране с 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC при клетки със (esiRAGE) и без (WT) заглушен рецептор RAGE. (Б) Количествен анализ на експресията на Vimentin, нормализирана спрямо контролата, приета за 1. Всички резултати са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Дензометричният анализ на експресията на белтъка е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$). Стойностите са представени в arbitrary units (A.U.).



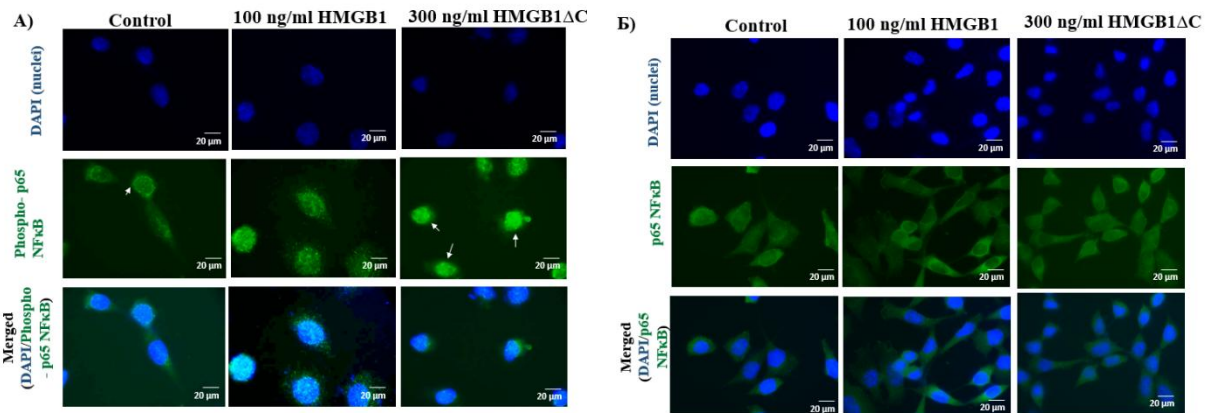
Фигура 20. Разлика в клетъчната инвазия при MDA-MB-231 със и без заглушен RAGE рецептор.

(A) Представителни изображения на MDA-MB-231 клетки преди третиране (0 ч) и 48 часа след третиране със 700 ng/mL HMGB1 и 500 ng/mL HMGB1ΔC при клетки със (esiRAGE) и без (WT) заглушен рецептор RAGE. (Б) Количествен анализ на клетъчната инвазия, нормализирана спрямо контролата, приета за 100% клетъчна инвазия. Всички резултати са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), $n = 3$. Измерванията и изчисляването на процента на инвазия са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с ** ($p < 0,01$).

4.7. HMGB1ΔC индуцира ядрена акумулация на фосфорилиран NF-κB (p65)

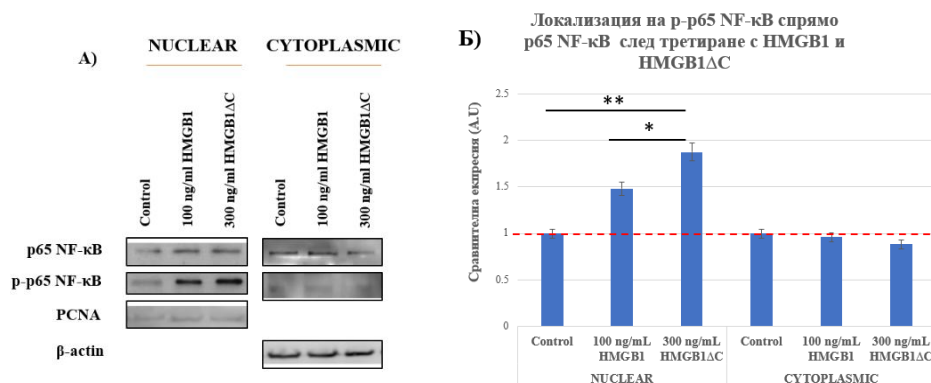
Тъй като е известно, че взаимодействието между HMGB1 и RAGE води до фосфорилиране на транскрипционния фактор NF-κB, а предходните резултати показаха, че HMGB1ΔC може да действа независимо от този рецептор, беше изследван неговият ефект върху активността на NF-κB. Активирането на NF-κB беше анализирано чрез имунофлуоресцентно оцветяване и субклетъчно фракциониране на ядрените и цитоплазмените фракции.

Резултатите показаха изразено ядрено натрупване на фосфорилиран p65 NF-κB при третиране с 300 ng/mL HMGB1ΔC в сравнение с 100 ng/mL HMGB1 (Фигура 21). Western blot анализът потвърди тези наблюдения, като демонстрира по-високи нива на фосфорилиран NF-κB в ядрената фракция след третиране с HMGB1ΔC (Фигура 22). Тези резултати сочат, че HMGB1ΔC е способен да активира NF-κB сигнализацията по механизъм, независим от RAGE, което вероятно допринася за неговия по-силен проинвазивен ефект.



Фигура 21. Имунофлуоресцентен анализ на транслокацията на фосфорилирания p65 NF-κB и тотален p65 NF-κB в MDA-MB-231 клетки след третиране с 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC

(А) Представителни изображения показващи ефекта на 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC върху локализацията на фосфорилирания p65 NF-κB. Интензитет на флуоресценция 800.0 ms. Скала: 20 μm (Б) Представителни изображения показващи ефекта на 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC върху локализацията на p65 NF-κB. Интензитет на флуоресценция 600.0 ms. Изображенията са заснети с инвертен флуоресцентен микроскоп AxioVert 200M (Zeiss), с увеличение 63× и имерзионно масло, и използване на подходящи филтри за зеления и син спектър. Скала: 20 μm Всички резултати са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), n = 3. Изображенията са обработени с помощта на софтуера ImageJ.



Фигура 22. Субклетъчно фракциониране и количествен анализ на фосфорилирания p65 NF-κB спрямо тоталния p65 NF-κB в ядрената и цитоплазмена фракция на клетки от MDA-MB-231.

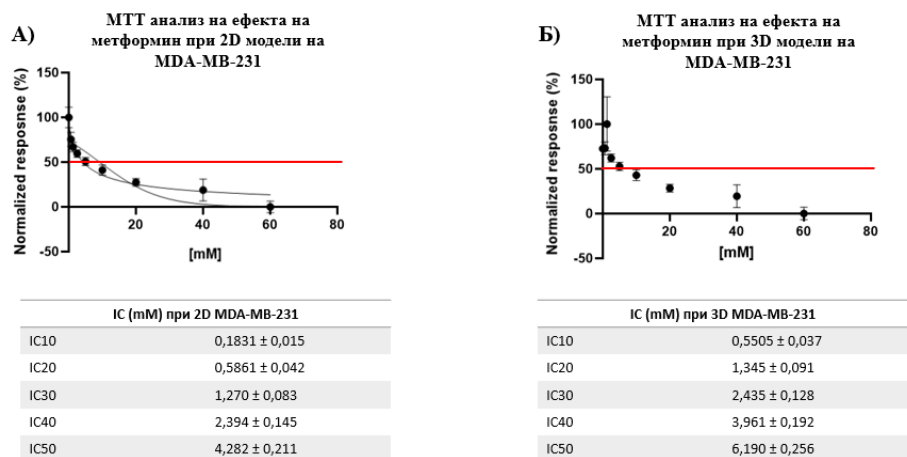
(А) Представителни изображения от Western blot на експресията на фосфорилиран p65 NF-κB и тотален p65 NF-κB спрямо PCNA в ядрото и β-actin в цитоплазмата. (Б) Количествен анализ на експресията фосфорилирания на p65 NF-κB спрямо тоталния p65 NF-κB в ядрената и цитоплазмената фракция, представена графично като средна стойност ± SD от три независими експеримента (n = 3). Статистическият анализ е извършен чрез ImageJ и one-way ANOVA, последван от Turkey post-hoc тестове за множествени сравнения. Статистически значимите разлики между групите са отбелязани със следните символи: *p < 0,05; **p < 0,01. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U.).

4.8. Определяне на цитотоксичността на метформин в 2D и 3D клетъчни модели

Целта беше да се определи концентрационният диапазон, при който метформин проявява минимална цитотоксичност, за да бъдат използвани субинхибиторни дози, отразяващи основно функционалните му ефекти, а не индуцирана клетъчна смърт.

Цитотоксичността беше оценена чрез MTT анализ в двуизмерен (2D) и триизмерен (3D) модел на клетъчната линия MDA-MB-231, при концентрации на метформин от 0,625 mM до 80 mM.

Резултатите показаха, че инхибиторните концентрации (IC₁₀–IC₅₀) при 3D моделите са приблизително до два пъти по-високи от тези, установени при 2D културите. Това наблюдение потвърждава по-високата лекарствена устойчивост на клетките в триизмерна конфигурация и подчертава значението на 3D моделите като по-физиологично релевантен инструмент за оценка на лекарствената чувствителност (Фигура 23).



Фигура 23. Дозовозависим ефект на метформин върху жизнеспособността на 2D и 3D модели от MDA-MB-231.

(А) МТТ анализ на MDA-MB-231 клетки, култивирани в двуизмерен монослой, третирани с нарастващи концентрации метформин (0,625–80 mM) в продължение на 72 часа. Данните са представени като средни стойности ± стандартно отклонение (SD) от минимум три независими биологични експеримента, всеки проведен в троен технически репликат. Представената таблица съдържа изчислените инхибиторни концентрации (IC10–IC50) за 2D модела. (Б) МТТ анализ на MDA-MB-231 клетки, култивирани като триизмерни туморни сфероид, третирани с нарастващи концентрации метформин (0,625–80 mM) в продължение на 96 часа. Представената таблица съдържа изчислените инхибиторни концентрации (IC10–IC50) за 3D модела. Анализът на резултатите е направен със софтуера GraphPad Prism 7. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойностите при двата модела са нормализирани спрямо нетретираната контрола (приета за 100% клетъчна жизнеспособност).

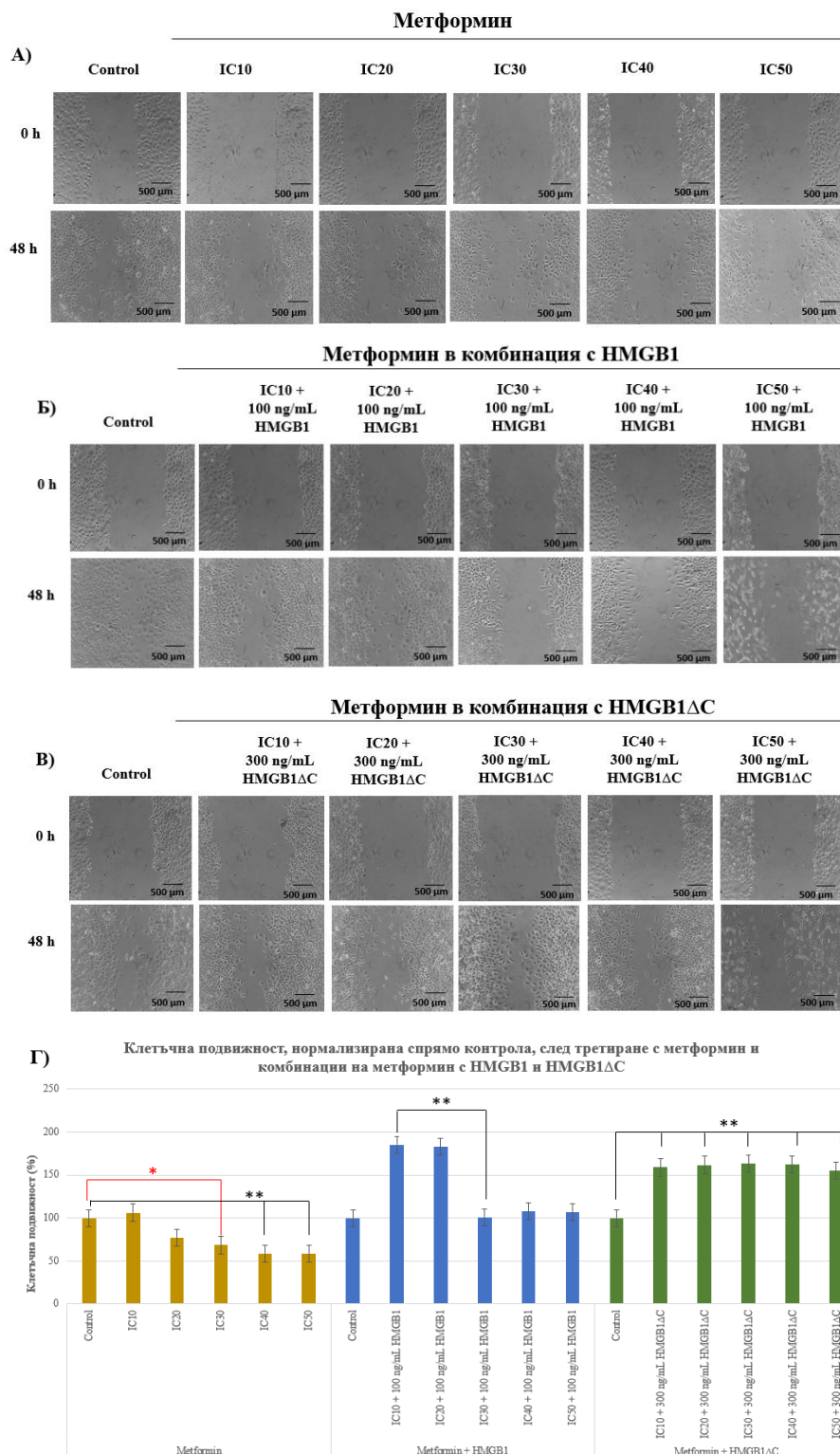
4.9. Влияние на метформин върху клетъчната подвижност, ЕМТ и инвазия, индуцирани от HMGB1 и HMGB1ΔC

За да се оцени функционалният ефект на метформин, първоначално беше извършен скрининг за определяне на субинхибиторна концентрация, която да упражнява максимално потискащо действие върху HMGB1- и/или HMGB1ΔC-индуцираните клетъчни процеси. Установено беше, че концентрацията, съответстваща на IC₅₀, е най-подходяща за последващите експерименти (Фигура 24, Фигура 26 и Фигура 28).

При тази концентрация бяха проведени анализи за клетъчна подвижност (wound healing assay), ЕМТ (експресия на N-cadherin и Vimentin) и инвазия на 3D сфероиди.

Резултатите показаха, че метформин самостоятелно предизвиква умерено потискане на клетъчната подвижност, инвазивност и експресията на ЕМТ-маркерите. Въпреки това, комбинираното третиране с 100 ng/mL HMGB1 доведе до значително намаляване на про-инвазивния ефект на HMGB1 върху всички изследвани параметри.

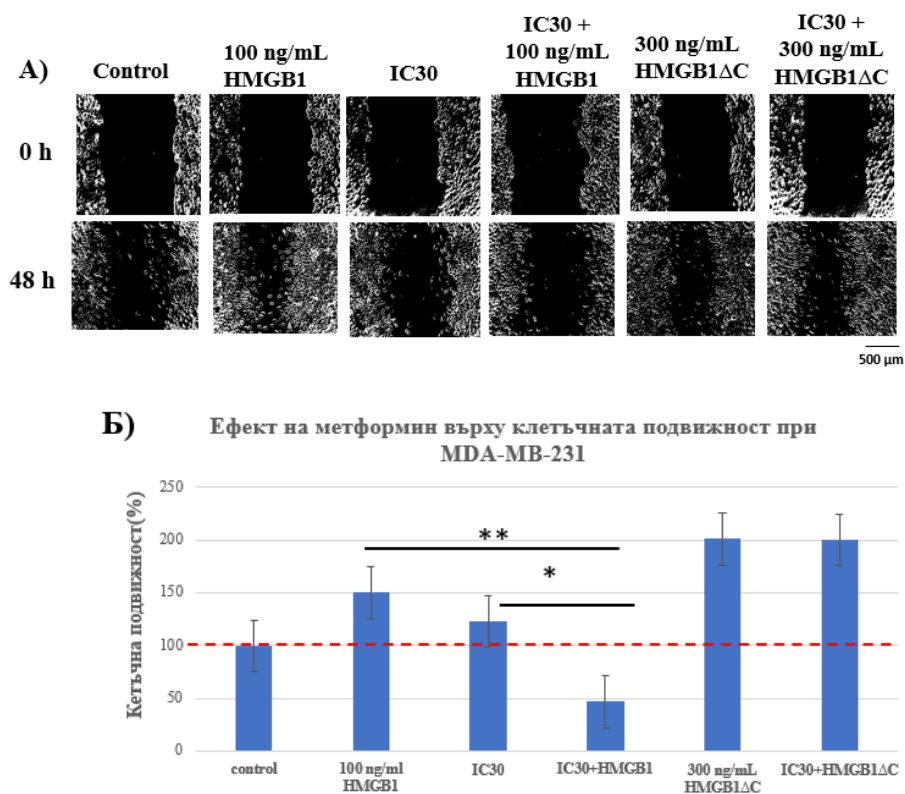
За разлика от това, при третиране с 300 ng/mL HMGB1ΔC не се наблюдаваше влияние на метформин, което предполага, че неговото инхибиращо действие е зависимо от присъствието на C-терминалната опашка на HMGB1 (Фигура 25, Фигура 27 и Фигура 29).



Фигура 24. Ефект на метформин самостоятелно и в комбинация с HMGB1 и HMGB1ΔC върху подвижността на MDA-MB-231, оценено чрез wound healing.

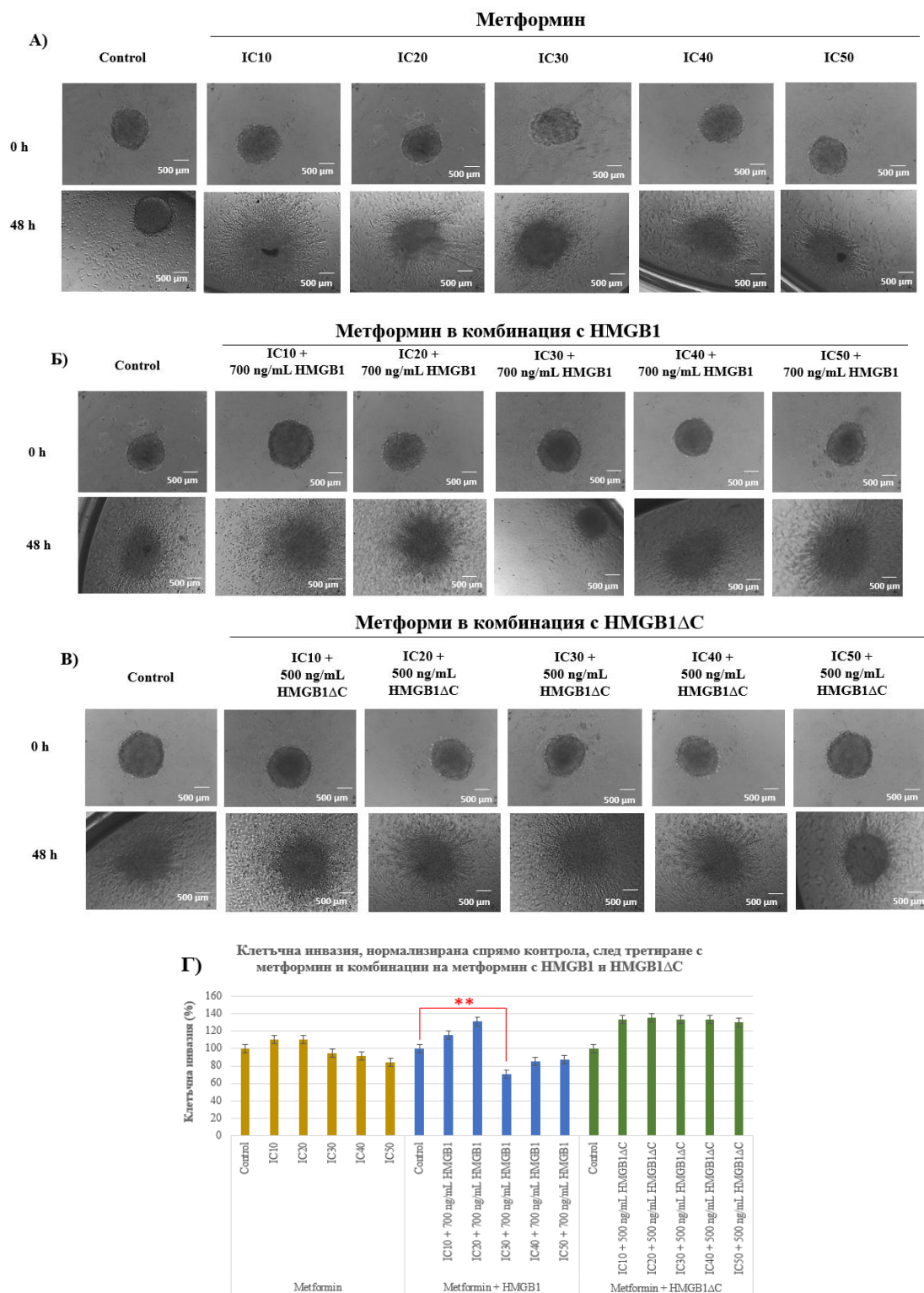
(А) Представителни изображения от wound healing анализ на MDA-MB-231 клетки, третирани с метформин при концентрации IC10, IC20, IC30, IC40 и IC50. (Б) Ефект от комбинирано третиране на метформин (IC10–IC50) със 100 ng/mL HMGB1. (В) Ефект от комбинирано третиране на метформин (IC10–IC50) с 300 ng/mL HMGB1ΔC. (Г)

Нормализиран процент подвижност спрямо контролната група, която е приета за 100%. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD от $n = 3$ независими експеримента. Количественият анализ е извършен с ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Turkey post-hoc за множествени сравнения. Статистически значимите разлики са обозначени със следния символ: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Всички изображения са заснети с микроскоп Axiovert 200M, обектив 10 $\times$. Скала: 500 μ m.



Фигура 25. Ефект на IC30 метформин върху HMGB1 и HMGB1 Δ C -индуцираната подвижност на клетки MDA-MB-231.

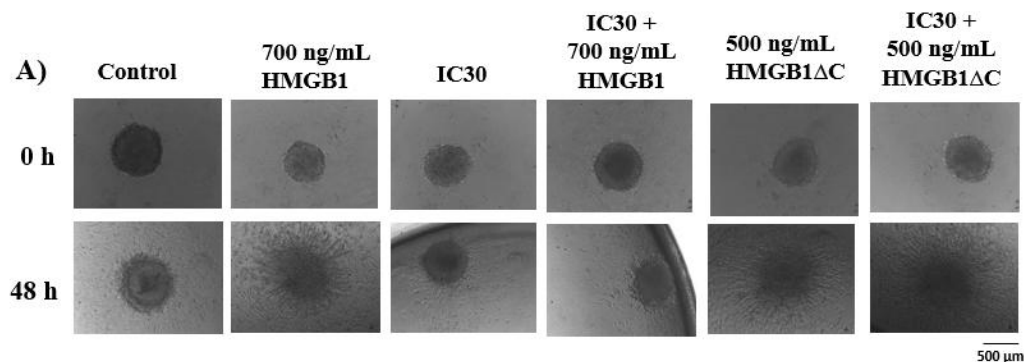
(A) Представителни изображения за клетъчна подвижност от wound healing тест, заснети на 0 и 48-ми час след третиране със 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1 Δ C, IC30 метформин и комбинация от метформин с HMGB1 и метформин с HMGB1 Δ C. (Б) Количествена оценка на клетъчната подвижност, нормализирана спрямо контролата, която е приета като 100% затваряне на раната. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD) от три независими експеримента, проведени в три повторения. Измерванията на ширината на раната и изчисляването на процента на затваряне са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ беше извършен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множество сравнения. Статистически значимите разлики между групите са отбелязани със следните символи: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



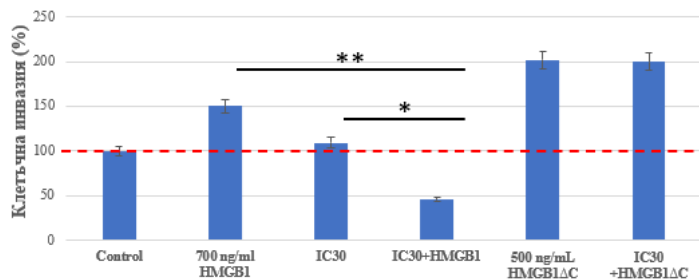
Фигура 26. Ефект на метформин самостоятелно и в комбинация с HMGB1 и HMGB1ΔC върху 3D инвазията на MDA-MB-231 сфероиди в колаген тип I матрикс

(А) Представителни изображения на сфероиди, третиране с метформин при концентрации IC10, IC20, IC30, IC40 и IC50. (Б) Ефект от комбинирано третиране на метформин (IC10–IC50) със 700 ng/mL HMGB1. (В) Ефект от комбинирано третиране на метформин (IC10–IC50) с 500 ng/mL HMGB1ΔC. Всички изображения са заснети с микроскоп Axiovert 200M,

обектив 10×. Скала: 500 μm . (Г) Нормализиран процент инвазия спрямо контролната група, която е приета за 100%. Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD от $n = 3$ независими експеримента. Измерванията и изчисляването на процента на инвазия са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Turkey post-hoc за множествени сравнения. Статистически значимите разлики са обозначени със следния символ: ** $p < 0,01$.

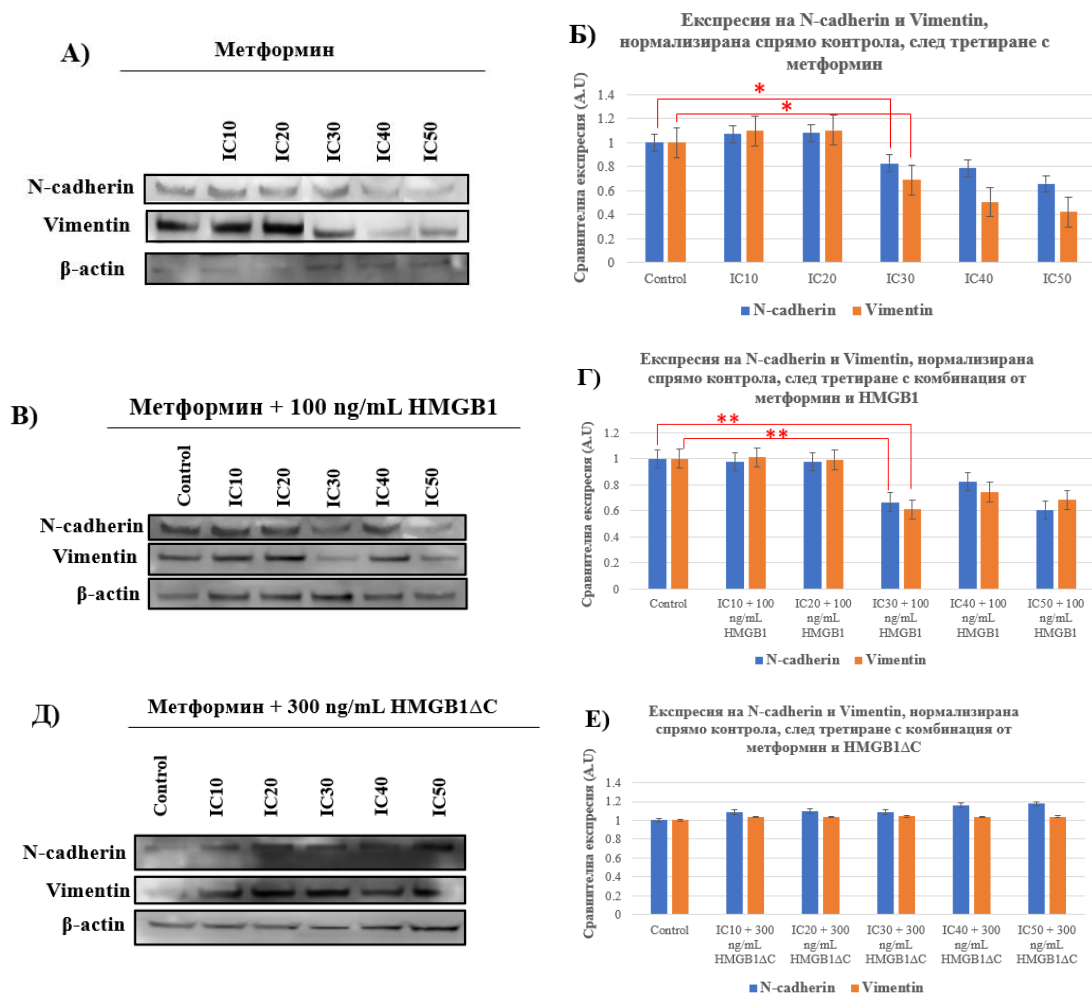


Б) Ефект на метформин върху клетъчната инвазия при MDA-MB-231



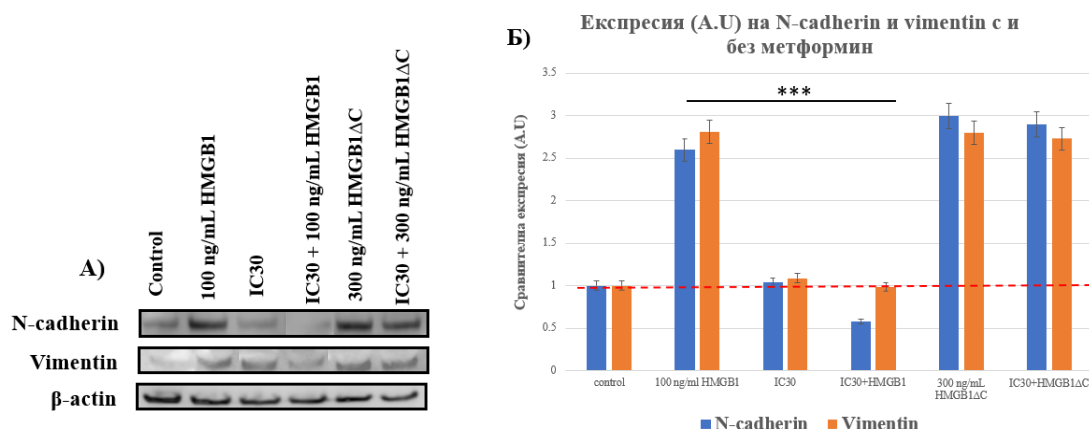
Фигура 27 . Ефект на IC30 метформин върху HMGB1 и HMGB1ΔC -индуцираната инвазия на клетки MDA-MB-231.

(А) Представителни изображения за клетъчна инвазия, заснети на 0 и 48-ми час след третиране със 700 ng/mL HMGB1, 500 ng/mL HMGB1ΔC, IC30 метформин и комбинация от метформин с HMGB1 и метформин с HMGB1ΔC. (Б) Количествена оценка на клетъчната инвазия, нормализирана спрямо контролата, която е приета като 100% клетъчна инвазия. Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартно отклонение (SD) от три независими експеримента, проведени в три повторения. Измерванията и изчисляването на процента на инвазия са извършени с помощта на софтуера ImageJ. Статистическият анализ беше извършен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множество сравнения. Статистически значимите разлики между групите са отбелязани със следните символи: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$



Фигура 28. Ефект на метформин самостоятелно и в комбинация с HMGB1 и HMGB1ΔC върху експресията на N-cadherin и Vimentin в MDA-MB-231.

(А) Представителни изображения от Western blot анализ на експресията на N-cadherin и Vimentin в клетъчни лизати, третиран с различни концентрации метформин (IC10, IC20, IC30, IC40, IC50). (Б) Експресия на N-cadherin и Vimentin, нормализирана спрямо контролната група, която е приета за 1. (В) Представителни изображения от Western blot анализ на експресията на N-cadherin и Vimentin след третиране с метформин и 100 ng/mL HMGB1. (Г) Експресия на N-cadherin и Vimentin, нормализирана спрямо контролната група, която е приета за 1. (Д) Представителни изображения от Western blot анализ на експресията на N-cadherin и Vimentin след третиране с метформин и 300 ng/mL HMGB1ΔC. (Е) Експресия на N-cadherin и Vimentin, нормализирана спрямо контролната група, която е приета за 1. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SD от три независими експеримента ($n = 3$). Количественият анализ е извършен с ImageJ. Статистическият анализ е извършен чрез one-way ANOVA, последван от Turkey post-hoc за множествени сравнения. Статистически значимите разлики са обозначени със следния символ: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U.).



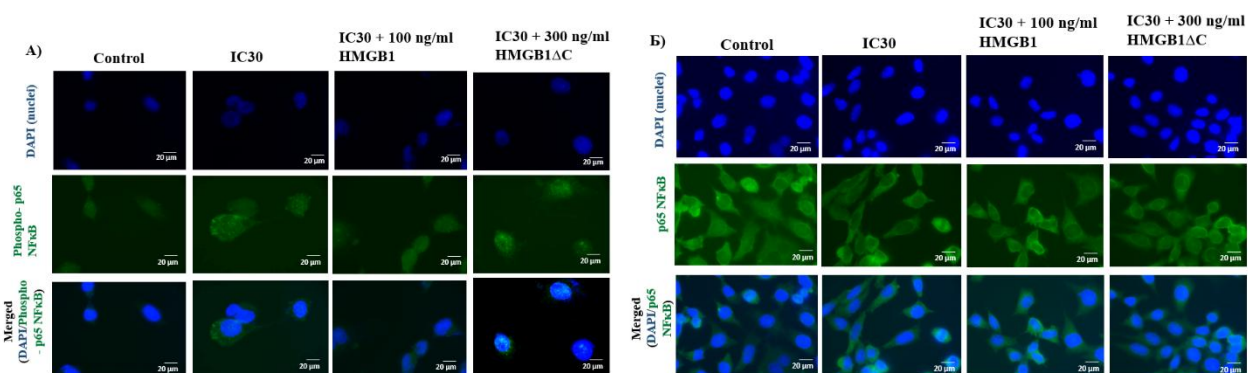
Фигура 29. Анализ на експресията на ЕМТ-маркери в MDA-MB-231 след третиране с HMGB1, HMGB1ΔC, метформин и комбинация на метформин с HMGB1 и метформин с HMGB1ΔC.

(А) Представителни Western blot изображения, показващи промяната в нивата на експресия на N-cadherin и Vimentin в MDA-MB-231 при третиране със 100 ng/mL HMGB1, 300 ng/mL HMGB1ΔC, IC30 метформин, метформин в комбинация с HMGB1 и комбинация на метформин с HMGB1ΔC; (Б) Количествен анализ на експресията на N-cadherin и Vimentin, базирана на денситометричен анализ на Western blot сигналите от три независими експеримента ($n = 3$). Денситометричният анализ на експресията на белтъците е извършен с помощта на софтуера ImageJ. Стойностите са представени като средна $\pm$ стандартно отклонение и са нормализирани стойности, представени като fold change спрямо контролната (нетретирана) група, при която нивото на експресия на белтъците е прието за 1; Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Tukey post-hoc тест за множествени сравнения. Стойности със статистическа значимост са означени с *** $p < 0,001$. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U).

4.10. Метформин потиска HMGB1-зависимата активация на NF-κB, но няма ефект върху HMGB1ΔC

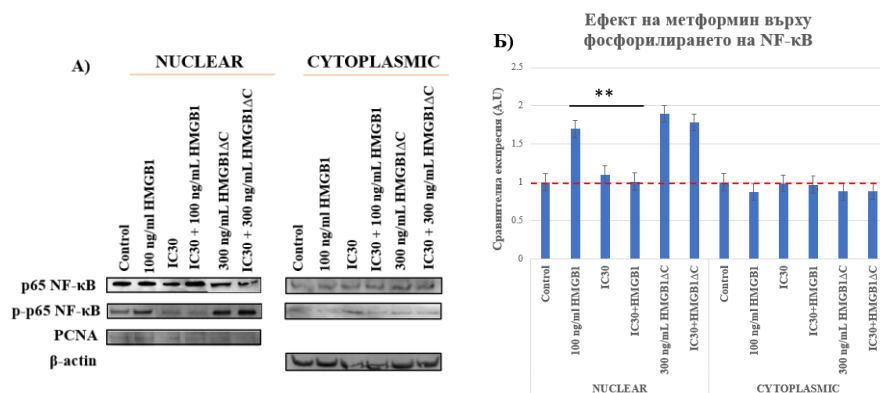
Фосфорилирането на NF-κB беше оценено чрез имунофлуоресцентен анализ и субклетъчно фракционироване. Комбинираното третиране на MDA-MB-231 със 100 ng/mL HMGB1 и субинхибиторна концентрация на метформин (IC₃₀) доведе до осезаемо намаляване на нивата на фосфорилирания p65 NF-κB в ядрената фракция в сравнение с клетките, третирани само с HMGB1.

Този ефект не се наблюдава при третиране с HMGB1ΔC, което допълнително подкрепя хипотезата, че метформин взаимодейства с C-терминалната опашка на HMGB1, като по този начин инхибира HMGB1–RAGE-медираната сигнализация (Фигура 30 и Фигура 31).



Фигура 30. Имунофлуоресцентен анализ на транслокацията на фосфорилирания p65 NF-κB и тоталния p65 NF-κB при MDA-MB-231 клетки след третиране с IC30 метформин самостоятелно и в комбинация със 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC

(А) Представителни изображения показващи ефекта върху локализацията на фосфорилирания p65 NF-κB в условия на третиране с IC30 метформин самостоятелно или в комбинация със 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC. Интензитет на флуоресценция 870.0 ms. Скала: 20 μm. (Б) Представителни изображения показващи ефекта върху локализацията на фосфорилирания p65 NF-κB в условия на третиране с IC30 метформин самостоятелно или в комбинация със 100 ng/mL HMGB1 и 300 ng/mL HMGB1ΔC. Интензитет на флуоресценция 670.0 ms. Скала: 20 μm. Изображенията са заснети с инвертен флуоресцентен микроскоп AxioVert 200M (Zeiss), с увеличение 63× и имерзионно масло, и използване на подходящи филтри за зеления и син спектър.



Фигура 31. Субклетъчно фракционироване и количествен анализ на фосфорилирания p65 NF-κB спрямо тоталния p65 NF-κB в ядрената и цитоплазматична фракция на клетки от MDA-MB-231 след третиране с метформин и комбинация от метформин с HMGB1 и с HMGB1ΔC.

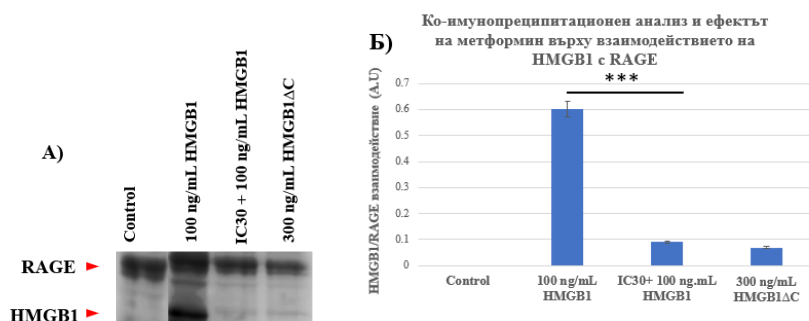
(А) Представителни изображения от Western blot на експресията на фосфорилиран p65 NF-κB и тотален p65 NF-κB спрямо PCNA в ядрото и β-actin в цитоплазмата. (Б) Количествен анализ на експресията фосфорилирания на p65 NF-κB в ядрената и цитоплазмената фракция спрямо тоталния p65 NF-κB, представена графично като средна стойност ± SD от три независими експеримента (n = 3). Статистическият анализ е извършен чрез ImageJ и one-way ANOVA, последван от Turkey post-hoc тестове за множествени сравнения. Статистически значимите разлики между групите са отбелязани със следните символи: ** p < 0,01. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U).

4.11. Метформин нарушава взаимодействието между HMGB1 и RAGE

За да се оцени дали метформин директно въздейства върху комплекса HMGB1–RAGE, беше проведен ко-имунопреципитационен анализ. При третиране с 100 ng/mL HMGB1 се наблюдава стабилно взаимодействие между HMGB1 и RAGE, докато при третиране с 300 ng/mL HMGB1ΔC такова взаимодействие не се установява.

Добавянето на IC₃₀ метформин към HMGB1-третираните клетки доведе до значително намаляване на свързването между HMGB1 и RAGE, което показва, че метформин може да възпрепятства формирането на HMGB1–RAGE комплекса.

Този ефект вероятно стои в основата на потискането на последващото фосфорилиране на NF-κB и EMT в условия на индуциране от HMGB1 (Фигура 32).



Фигура 32. Ко-имунопреципитационен анализ за оценка на взаимодействието между HMGB1 и RAGE в MDA-MB-231 и ефектът на метформин върху това взаимодействие.

(А) Представителни изображения от Western blot анализ на ко-имунопреципитати, показващи присъствието на RAGE и HMGB1 в комплекс след третиране със 100 ng/mL HMGB1 и липсата на такъв комплекс след третиране с 300 ng/mL HMGB1ΔC. В допълнение, добавяне на IC₃₀ метформин към 100 ng/mL HMGB1 намалява взаимодействието на HMGB1 с RAGE. (Б) Количественият анализ на това взаимодействие, изчислен като средна стойност ± SD от три независими експеримента (n = 3). Количественият анализ е извършен с ImageJ. Статистическият анализ е проведен чрез one-way ANOVA, последван от Turkey post-hoc за множествени сравнения. Статистически значимите разлики са означени с *** p < 0,001. Стойностите са представени в arbitrary units (A.U).

5. Дискусия

Анализът на ефектите на HMGB1, неговия скъсен вариант без С-терминална опашка (HMGB1ΔC) и TGF-β върху клетъчната подвижност и ЕМТ показва ясно изразена клетъчна специфичност, зависеща от молекулния контекст. Използването на TGF-β като класически индуктор на ЕМТ [18] осигурява методологична валидност и позволява директно сравнение с утвърдени модели [19]. Резултатите показват, че както HMGB1, така и HMGB1ΔC индуцират ЕМТ и миграция единствено в MDA-MB-231, но не и в MCF-7 или SK-BR-3, което подчертава, че про-метастатичните ефекти на HMGB1 са зависими от агресивния клетъчен фенотип [20]. Този факт се обяснява с повишената базова експресия на HMGB1, RAGE и фосфорилиран NF-κB в MDA-MB-231, което създава автоиндуктивен цикъл HMGB1–RAGE–NF-κB [21].

Наблюдаваната дозозависимост на ефекта, при която високите концентрации отслабват про-ЕМТ активността, е в съответствие с нелинейната регулация на HMGB1 сигнализацията [227]. Вероятните механизми включват рецепторно насищане, отрицателна обратна връзка по NF-κB пътя или окисление на HMGB1, водещо до неговата функционална деактивация [192].

Най-същественото откритие е, че HMGB1ΔC индуцира по-силен ЕМТ и инвазивност спрямо пълноверижния HMGB1, което подкрепя хипотезата за автоинхибираща роля на С-терминалната опашка. Отстраняването ѝ „разкрива“ рецептор-свързващи мотиви в Box A/B домейните, повишавайки афинитета към RAGE и TLR рецептори [6], [11], [12]. Това вероятно улеснява олигомеризацията на лиганда, клъстеризацията на рецепторите и продължителната NF-κB сигнализация. В резултат най-вероятно се засилва експресията на ЕМТ транскрипционни фактори (Snail, Twist, ZEB1) и матрични металопротеинази, което води до по-инвазивен фенотип [6].

Редокс състоянието и посттранслационните модификации допълнително модулират активността на HMGB1 [6]. В туморната микросреда, богата на оксидативен стрес, HMGB1ΔC може да бъде по-стабилен и функционално активен. При 3D култури, които по-добре имитират физиологичната тъканна архитектура, ефектът на HMGB1ΔC върху инвазията е още по-силен, вероятно поради по-добра дифузия и по-ефективно взаимодействие с рецепторите. Това подчертава значението на триизмерните клетъчни модели като по-физиологично релевантен инструмент за оценка на метастатичния потенциал.

Настоящото изследване също така показва, че метформин, който е добре познат антидиабетичен медикамент, инхибира HMGB1-индуцирания ЕМТ, клетъчната подвижност и инвазия по концентрационно зависим начин. Метформин намалява фосфорилирането на NF-κB и нарушава свързването между HMGB1 и RAGE, което демонстрира вероятно пряко взаимодействие между метформин и С-терминалната опашка на HMGB1. Липсата на ефект върху HMGB1ΔC потвърждава, че именно тази структурна област е критичната мишена на

метформин. Тези резултати са в съответствие с предходни данни, според които метформин потиска миграцията и ЕМТ в различни туморни клетъчни линии [22].

В заключение, настоящата работа очертава нов механистичен модел, според който премахването на С-терминалната опашка на HMGB1 може да усили неговата извънклетъчна про-туморна активност, а метформин – чрез взаимодействие с тази опашка – може селективно да блокира HMGB1/RAGE/NF- κ B оста. Това определя HMGB1 като структурно и терапевтично уязвим фактор в процесите на метастазиране при рак на млечната жлеза и предлага потенциална възможност за репозициониране на метформин като противотуморен агент [23], [24].

6. Заключение

Настоящото изследване установява, че ефектите на HMGB1 и HMGB1ΔC върху EMT, клетъчната подвижност и инвазия при рак на млечната жлеза са субтипово специфични и най-силно изразени в тройно-негативните MDA-MB-231 клетки, характеризиращи се с активна HMGB1–RAGE–NF-κB сигнална ос. Премахването на C-терминалната опашка засилва про-инвазивните свойства на белтъка, вероятно чрез по-ефективно взаимодействие с рецептори, различни от RAGE, и чрез по-продължителна активация на NF-κB. Метформин ефективно потиска HMGB1-индуцираните ефекти, като блокира взаимодействието му с RAGE, но не повлиява действието на HMGB1ΔC, което подчертава структурната зависимост на този механизъм. Тези резултати разкриват нова терапевтична възможност за насочване към HMGB1-медираната сигнализация при агресивни подтипове на рак на млечната жлеза чрез достъпно, евтино и с ниска цитотоксичност лекарство като метформин.

7. Изводи и приноси

Основните изводи от този дисертационен труд са, че:

1. Тройно-негативният подтип има най-високи базови нива на HMGB1, RAGE и фосфорилиран NF-κB спрямо други подтипове, и затова вероятно е най-чувствителен към индуцирана клетъчна подвижност и активация на EMT при третиране с HMGB1 и HMGB1ΔC
2. HMGB1ΔC индуцира EMT, доказано чрез увеличение в експресията на EMT маркери (N-cadherin и Vimentin), както и високо ниво на фосфорилиране на NF-κB, но той вероятно действа по RAGE-независим начин
3. Метформин предотвратява взаимодействието между HMGB1 и RAGE, което води до по-ниска подвижност, инвазия, активиране на NF-κB и EMT

Основните приноси от този дисертационен труд са:

1. Първо проучване върху ефекта скъсения HMGB1 без опашка върху EMT в модел на рак на млечната жлеза
2. Първо доказателство, че скъсеният HMGB1 без опашка активира EMT в по-голяма степен от нативната му форма, но по RAGE-независим път
3. Първо изследване на ефекта на метформин върху HMGB1-индуциран EMT
4. Първо доказателство, че метформин е ефективен инхибитор на HMGB1-индуциран EMT, клетъчна подвижност и инвазия
5. Разработване и оптимизиране на протокол за формиране на 3D сфероиди с добра преживяемост и лесен начин на отглеждане и манипулации

8. Използвана литература

- [1] Y. Zhang *et al.*, “Global burden of female breast cancer: new estimates in 2022, temporal trend and future projections up to 2050 based on the latest release from GLOBOCAN,” *J. Natl. Cancer Cent.*, vol. 5, no. 3, pp. 287–296, 2025, doi: 10.1016/j.jncc.2025.02.002.
- [2] H. Dillekås, M. S. Rogers, and O. Straume, “Are 90% of deaths from cancer caused by metastases?,” *Cancer Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 5574–5576, 2019, doi: 10.1002/cam4.2474.
- [3] J. Pasquier, N. Abu-Kaoud, H. Al Thani, and A. Rafii, “Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective,” *J. Oncol.*, vol. 2015, pp. 19–21, 2015, doi: 10.1155/2015/792182.
- [4] Y. Huang, W. Hong, and X. Wei, “The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis,” *J. Hematol. Oncol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–27, 2022, doi: 10.1186/s13045-022-01347-8.
- [5] Singh A, Settleman J., “EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer,” *Oncogene*, vol. 29, no. 34, pp. 4741–4751, 2010.
- [6] R. Chen, R. Kang, and D. Tang, “The mechanism of HMGB1 secretion and release,” *Nature*, vol. 54, no. 2, pp. 91–102, 2022, doi: 10.1038/s12276-022-00736-w.
- [7] H. W. Chung and J. B. Lim, “High-mobility group box-1 contributes tumor angiogenesis under interleukin-8 mediation during gastric cancer progression,” *Cancer Sci.*, vol. 108, no. 8, pp. 1594–1601, 2017, doi: 10.1111/cas.13288.
- [8] D. Yang, Q. Chen, H. Yang, K. J. Tracey, M. Bustin, and J. J. Oppenheim, “High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 81, no. 1, pp. 59–66, 2007, doi: 10.1189/jlb.0306180.
- [9] R. Chen *et al.*, “HMGB1 as a potential biomarker and therapeutic target for severe COVID-19,” *Heliyon*, vol. 6, no. 12, p. e05672, 2020, doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05672.
- [10] J. Jiang, M. Sun, Y. Wang, W. Huang, and L. Xia, “Deciphering the roles of the HMGB family in cancer: Insights from subcellular localization dynamics,” *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 78, no. June, pp. 85–104, 2024, doi: 10.1016/j.cytogfr.2024.07.004.
- [11] M. S. Kwak, H. S. Kim, B. Lee, Y. H. Kim, M. Son, and J. S. Shin, “Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology,” *Front. Immunol.*, vol. 11, no. June, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01189.
- [12] M. Lorvellec *et al.*, “HMGB1 cleavage by complement C1s and its potent anti-inflammatory product,” *Front. Immunol.*, vol. 14, no. April, pp. 1–16, 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1151731.
- [13] H. Aucott, A. Sowinska, H. E. Harris, and P. Lundback, “Ligation of free HMGB1 to TLR2 in the absence of ligand is negatively regulated by the C-terminal tail domain,” *Mol. Med.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1186/s10020-018-0021-x.
- [14] H. Yang *et al.*, “A critical cysteine is required for HMGB1 binding to toll-like receptor 4

- and activation of macrophage cytokine release,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 26, pp. 11942–11947, 2010, doi: 10.1073/pnas.1003893107.
- [15] J. Todorova, S. Myashkova, M. Petrova, A. Gospodinov, and E. Pasheva, “The motility of breast cancer cells is stimulated by HMGB1/RAGE interaction but the truncated form lacking the C terminus has no effect,” *Biodiscovery*, vol. 24, no. September, 2022, doi: 10.3897/biodiscovery.24.e93641.
 - [16] Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., “The multifunctional protein HMGB1: 50 years of discovery,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 824–841, 2023.
 - [17] T. Horiuchi *et al.*, “Metformin directly binds the alarmin HMGB1 and inhibits its proinflammatory activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 20, pp. 8436–8446, 2017, doi: 10.1074/jbc.M116.769380.
 - [18] Xu J, Lamouille S, Derynck R., “TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition,” *Cell Res.*, vol. 19, no. 2, pp. 156–172, 2009.
 - [19] D. Tang *et al.*, “Endogenous HMGB1 regulates autophagy,” *J. Cell Biol.*, vol. 190, no. 5, pp. 881–892, 2010, doi: 10.1083/jcb.200911078.
 - [20] H. Dong, L. Zhang, and S. Liu, “Targeting HMGB1: An available Therapeutic Strategy for Breast Cancer Therapy,” *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 18, no. 8, pp. 3421–3434, 2022, doi: 10.7150/ijbs.73504.
 - [21] Fan A, Gao M, Tang X, Jiao M, Wang C, Wei Y, Gong Q, Zhong J, “HMGB1/RAGE axis in tumor development: unraveling its significance,” *Front. Oncol.*, vol. 14, 2024.
 - [22] Y. C. Chen, H. Li, and J. Wang, “Mechanisms of metformin inhibiting cancer invasion and migration,” *Am. J. Transl. Res.*, vol. 12, no. 9, pp. 4885–4901, 2020.
 - [23] H. Xu *et al.*, “Metformin Use Is Associated With Better Survival of Breast Cancer Patients With Diabetes: A Meta-Analysis,” *Oncologist*, vol. 20, no. 11, pp. 1236–1244, 2015, doi: 10.1634/theoncologist.2015-0096.
 - [24] C. F. M. Araujo *et al.*, “Metformin for the treatment of breast cancer: Protocol for a scoping review of randomised clinical trials,” *BMJ Open*, vol. 11, no. 8, 2021, doi: 10.1136/bmjopen-2020-044283.

СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Vladimirova, D.**, Staneva, S., & Ugrinova, I. (2025). Multifaceted role of HMGB1: From nuclear functions to cytoplasmic and extracellular signaling in inflammation and cancer. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 143, 271-300.

(Q1, IF 2.30 за 2024 г. Web of Science)

2. Yusein-Myashkova, S., **Vladimirova, D.**, Gospodinov, A., Ugrinova, I., & Todorova, J. (2025). Metformin Inhibits Cell Motility and Proliferation of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Blocking HMGB1/RAGE Signaling. *Cells*, 14(8), 590.

(Q1, IF 5.2 за 2024 г. Web of Science)

3. **Vladimirova, D.**, Yusein-Myashkova, S., Ugrinova, I., & Todorova, J. (2025, June). The Role of Methylcellulose in the Development of Physiologically Relevant in vitro Models for Cancer Research. In *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* (Vol. 78, No. 6, pp. 854-861).

(Q3, IF 0.3 за 2024 г. Web of Science)

4. **Vladimirova, D.**, Yusein-Myashkova, S., Ugrinova, I., & Todorova, J. (2025, July). Targeting HMGB1/RAGE Axis with Metformin: a Potential Anti-Metastatic Strategy in Lung Adenocarcinoma. In *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences* (Vol. 78, No. 7, pp. 1000-1007).

(Q3, IF 0.3 за 2024 г. Web of Science)

СПИСЪК С УЧАСТИЯ НА МЕЖДУНАРОДНИ И НАЦИОНАЛНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. **5th Interdisciplinary PhD forum with international participation (16-19 April 2024), Kyustendil**

C nocmep „Examining the role of HMGB1/RAGE interaction in triple-negative breast cancer cell invasion”

Desislava Vladimirova, Shazie Yusein-Myashkova, Iva Ugrinova, Jordana Todorova

2. **FEBS 48th Congress, Milan (29 June- 3 July 2024)**

C nocmep „Inhibition of HMGB1/RAGE suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and cell invasion in 3D triple-negative breast cancer models”

Desislava Vladimirova, Shazie Yusein-Myashkova, Iva Ugrinova, Jordana Todorova

3. **EACR Conference: The systemic consequences of cancer” (Virtual) (25-26 February 2025)**

C nocmep „Metformin disrupts HMGB1/RAGE-driven metabolic reprogramming to suppress motility, epithelial-to-mesenchymal transition, and invasion in triple-negative breast cancer“

Desislava Vladimirova, Shazie Yusein-Myashkova, Iva Ugrinova, Jordana Todorova