

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS
VYSTYMO SI BIOLOGIJOS SKYRIUS

Natalija Uralova

*Raumeninės kilmės kamieninių ląstelių žūtis ir išgyvenimo
mechanizmų tyrimas jų proliferacijos ir diferenciacijos metu*

Baigiamasis magistro darbas

Darbo vadovė
dr. Audronė-Valerija Kalvelytė

VILNIUS 2007

TURINYS

Sutrumpinimai.....	4
Įvadas.....	5
1. Literatūra.....	6
1.1. Ląstelių terapija ir širdies pažeidimai.....	6
1.2. Raumens kamieninių ląstelių diferenciacijos procesas ir jo reguliacija.....	8
1.3. Apoptozė ir kitos ląstelių mirties formos.....	12
1.4. Apoptozės iniciacija.....	13
1.5. MAPK signalo perdavimo kelias.....	15
1.5.1. ERK 1/2 MAP kinazės.....	17
1.5.2. JNK MAP kinazės signalo perdavimo kelias.....	18
1.5.3. p38 MAP kinazės.....	20
1.5.4. MAP kinazių vaidmuo širdies ląstelių apoptozės reguliacijoje.....	21
1.6. Kardiotoksinės medžiagos – veikimo mechanizmas ir jų pagrindiniai taikiniai ląstelėje.....	24
1.7. MAP kinazių inhibitoriai, jų veikimo principai.....	26
2. Darbo metodai.....	28
2.1. Pirminių miogeninių ląstelių auginimas <i>in vitro</i>	28
2.2. Ląstelių diferenciacija.....	28
2.3. Gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu testu.....	28
2.4. Imunofluorocitocheminis metodas.....	29
2.5. Imunocitochemija su antikūnais konjuguotais su šarmine fosfataze.....	29
2.6. Ląstelių dažymas kristalvioletu.....	29
2.7. Ląstelių dažymas azuro-eozino dažais (pagal Romanovski).....	30
2.8. Ląstelių lizavimas.....	30
2.9. Baltymų elektroforezė.....	31
2.10. Imunoblotingas.....	32
2.11. Baltymo kiekio nustatymas Bradford metodu.....	33
2.12. Naudotos medžiagos.....	33
2.13. Statistinė duomenų analizė.....	34
3. Rezultatai ir jų aptarimas.....	35
3.1. Miogeninių ląstelių charakterizavimas ir specifinių diferenciacijos markerių nustatymas.....	35
3.2. Miogeninių ląstelių žūties tyrimai po genotoksinių medžiagų poveikio ląstelių diferenciacijos, proliferacijos ir kontaktinio augimo metu.....	39
3.3. Miogeninių ląstelių išgyvenimo/žūties procesuose dalyvaujančių MAP kinazių tyrimas ląstelių diferenciacijos ir kontaktinio augimo metu.....	43
3.3.1. ERK signalinio kelio vaidmuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu diferencijuotose ir kontaktinėse ląstelėse.....	44
3.3.2. p38 signalinio kelio vaidmuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu diferencijuotose ir kontaktinėse ląstelėse.....	47
3.3.3. JNK signalinio kelio vaidmuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu diferencijuotose, kontaktinėse ir proliferuojančiose ląstelėse.....	51
4. Išvados.....	61

Santrauka.....	62
Summary.....	63
Literatūros sąrašas.....	64

SUTRUMPINIMAI

Apaf-1 – apoptozę aktyvuojantis faktorius 1;
Bcl – apoptozę reguluojančių baltymų šeima;
Bcl-2, Bcl-xL – apoptozę slopinantys Bcl-2 šeimos baltymai;
Bcl-xS, Bax, Bad, Bid, Bak – apoptozę skatinantys Bcl-2 šeimos baltymai;
Cit c – citochromas c;
DMEM – Dulbecco modifikuota Eagle'o terpė;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
EGF – epidermio augimo faktorius (angl. *epidermal growth factor*);
ERK – ekstraląstelinio signalo reguluojama proteinkinazė;
FasL – Fas receptoriaus ligandas;
FB – fosfatinis buferis;
FGF – fibroblastų augimo faktorius (angl. *fibroblast growth factor*);
FVS – fetalinis veršelių serumas;
GM-CSF – granulocitų-monocitų kolonijas stimuliuojantis faktorius;
HGF – hepatocitų augimo faktorius;
IGF – insulino augimo faktoriai (angl. *insulin-like growth factor*);
IL-3, 4, 5, 6, 10 – interleukinai-3, 4, 5, 6, 10;
IMDM - Iscove'o modifikuota Dulbecco terpė.
JNK – c-Jun N-galinė kinazė;
JSA – jaučio serumo albuminas;
MAPK – mitogenų aktyvinamos proteinkinazės;
MEF2 - angl. *myocyte enhancer binding factor-2*;
MHC – miozino sunkioji grandinė (angl. *myosin heavy chain*);
MRF - miogeniniais reguliatoriniai faktoriai;
p38 – MAP kinazė;
PDGF – trombocitų augimo faktorius (angl. *platelet-derived growth factor*);
pRb – retinoblastomos baltymas;
RPMI – terpė, naudota ląstelių auginimui;
TNF – navikų nekrozės faktorius;
TRAIL - navikų nekrozės faktoriaus receptoriaus ligandai;

IVADAS

Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis sergamumas ir mirtingumas dėl širdies ir kraujagyslių ligų Baltijos šalyse vienas didžiausių. Lietuvoje daugiau kaip 50 % visų mirčių priežastis yra širdies ir kraujagyslių ligos, 29 % žmonių netenka darbingumo šių ligų pasėkoje. Kai kurias širdies funkcijas įmanoma pagerinti chirurginiu būdu arba transplantuojant donoro organus ar audinius, tačiau beveik nieko negalima padaryti žuvus kardiomiocitams, pavyzdžiui įvykus miokardo infarktui, nes žaizdos miokarde, šiuo atveju, gyja dėka besidauginančių jungiamojo audinio ląstelių, o tai pakeičia širdies darbą. Tuo tarpu skeleto raumenų regeneracija vyksta dėka kamieninių miogeninių ląstelių, kurios išsidėsto šalia diferencijuotų raumeninių skaidulų. Sveikame organe šios ląstelės nesidaugina, tačiau, atsiradus pažeidimui, jos migruoja į pažeidimo vietą ir aktyvinasi. Širdies raumenyje taip pat yra surasta tokių ląstelių, tačiau čia jų yra mažai. Ląstelinė kardiomioplastija arba kamieninių miogeninių ląstelių persodinimas į širdies raumenį galėtų būti vienas iš miokardo infarkto gydymo metodų. Tai yra nauja, sparčiai besivystanti ir perspektyvi biomedicininė mokslų sritis, ateityje galėsianti pakeisti organų ir audinių transplantaciją bei palengvinti degeneracinių ligų gydymą.

Viena iš svarbiausių ląstelių transplantacijos metu išskylančių problemų yra transplantuotų miogeninių ląstelių išgyvenimas bei integracija. Žinoma, kad didelė dalis (iki 90 %) persodintų ląstelių žūva per pirmas 48 valandas po transplantacijos dėl uždegiminio proceso metu aktyvinamų reaktyvių deguonies darinių, citokinai ir kt. Jie lemia atsaką į stresą, dėlto stabdomas ląstelių augimas ir inicijuojamas apoptozės procesas. Be to, po transplantacijos širdyje susiduria skirtingos funkcinės būklės ląstelės. Tai proliferuojančios ir diferencijuojančios transplantuotos kamieninės ląstelės bei diferencijuoti kardiomiocitai. Nustatyta, kad po transplantacijos pirmas paras ląstelės dauginasi, o vėliau diferencijuojasi į audiniui būdingas ląsteles. Tačiau vis dar trūksta žinių apie kamieninių ląstelių išgyvenimo bei žūties reguliaciją, joms atsakant į įvairius streso faktorius, atsirandančius pažeistame širdies audinyje. Iki šiol nėra duomenų ir apie individualių signalinių molekulių vaidmenį apoptozės reguliacijoje ląstelėms diferencijuojantis į audiniui specifines ląsteles.

Šiame darbe ir buvo siekiama identifikuoti signalinius kelius, reguliuojančius kamieninių, iš raumens išskirtų, ląstelių žūtį bei išgyvenimą po genotoksinių medžiagų – cisplatinos ir daunorubicino bei oksidacinį stresą širdyje imituojančios medžiagos - fiziologinio apoptozės induktoriaus - azoto oksido donoro NOC-18 poveikio ląstelių diferenciacijos proceso metu.

Darbo tikslas – kamieninių ląstelių, išskirtų iš raumens ir pasižyminčių neribotu proliferaciniu potencialu *in vitro*, apoptozės reguliavimo molekulinį mechanizmų tyrimas miogeninės diferenciacijos metu.

Darbo uždaviniai:

- Charakterizuoti iš raumens gautas kamieninės linijos ląsteles bei įvertinti jų miogeninės diferenciacijos galimybes.
- Įvertinti miogeninių ląstelių jautrumą apoptozės induktoriams ląstelių diferenciacijos metu.
- Nustatyti apoptozės induktorių poveikį mitogenų aktyvinamų kinazių (MAPK) - ERK, JNK ir p38 - raiškai ir fosforilinimui diferencijuotose ląstelėse.
- Įvertinti MAP kinazių - ERK, JNK ir p38 - vaidmenį apoptozės indukcijoje miogeninės kamieninių ląstelių diferenciacijos metu.

1. LITERATŪRA

1.1. Ląstelių terapija ir širdies pažeidimai

Ląstelių terapija (citoterapija), kai suaugusiame organizme pažeistos ląstelės yra pakeičiamos sveikomis, yra vienas perspektyvių įvairių degeneracinių ligų gydymo būdų. Širdies audinys pasižymi labai ribotu regeneraciniu potencialu. Čia esančių kamieninių ląstelių nepakanka širdies funkcijai atstatyti, žaizdos gyja dėka besidauginančių jungiamojo audinio ląstelių, o tai įtakoja organo darbą. Šiuo metu įvairių širdies ligų, tarp jų ir infarkto, gydymui ieškoma labiausiai tinkamų ląstelių. Tyrimai atliekami su įvairios kilmės ląstelėmis – nuo embrioninių iki suaugusio individo autologinių ląstelių [Laflamme ir kt., 2005; Grounds ir kt., 2003]. Autologinė skeleto raumenų kamieninių (miogeninių) ląstelių transplantacija yra patraukli tuo, kad ląstelės gali būti išskiriamos iš paciento skeleto raumenų, padauginamos *in vitro* ir transplantuojamos į širdį nesukeliant imuninio atsako. Be to, miogeninių ląstelių naudojimas leistų išvengti ir etinių problemų, su kuriomis susiduriama embrioninių ląstelių atveju.

Miogeninės arba satelitinės raumenų ląstelės išsidėsto šalia diferencijuotų raumeninių skaidulų. Sveikame organe šios ląstelės nesidaugina, tačiau atsiradus pažeidimui jos migruoja į žaizdos vietą, aktyvinasi proliferacijai ir galiausiai susilieja su pažeistomis raumenų miofibrilėmis arba viena su kita, suformuodamos naujas daugiabranduoles raumenų ląsteles.

Viena iš svarbiausių ląstelių transplantacijos problemų – transplantuojamų miogeninių ląstelių išgyvenimas pažeistame širdies audinyje. Tikintis atstatyti pažeistą širdies raumenį, po transplantacijos mioblastai turi kelias paras daugintis bei vystytis į miocitus. Tačiau didelė dalis (iki 90%) transplantuotų ląstelių žūva per pirmas 48 valandas dėl patologiškai židinyje besivystančio uždegiminio proceso bei kitų priežasčių [Irintchev ir kt., 1995; Pouzet ir kt., 2000; Beauchamp ir kt., 1999]. Apoptozės vaidmuo, jos mechanizmai, tiek širdies išemijos patologiškai židinyje, tiek mioblastų bei širdies miocitų kultūroje yra vis dar neaiškūs [Elsasser ir kt., 2001]. Iki šiol mažai žinoma apie streso faktorių, atsirandančių pažeistame širdies audinyje, vaidmenį bei

mechanizmus, sąlygojančius transplantuojamų ląstelių atsparumą ar jautrumą apoptozę bei nekrozę sukeliantiems faktoriams.

Transplantuotos ląstelės patologiniame židinyje patiria įvairius stresus ir pakenkimus. Nustatyta, kad patologinio proceso eigoje atsiradusiame židinyje (toks būna ir įvykus miokardo infarktui), gaminasi ir išsiskiria įvairios biologiškai aktyvios medžiagos, įtakojančios ląstelių išgyvenimą. Tai gali būti reaktyvaus deguonies junginiai bei įvairūs citokinai. Yra duomenų, rodančių, kad tiek šie agentai, tiek ir imuninis atsakas bei uždegiminiai veiksniai įtakoja į pažeistą raumeninį audinį transplantuotų mioblastų gyvybingumą. Be to, žmogus vartoja įvairiausių vaistus, kurie taip pat gali būti kardiotoksiški.

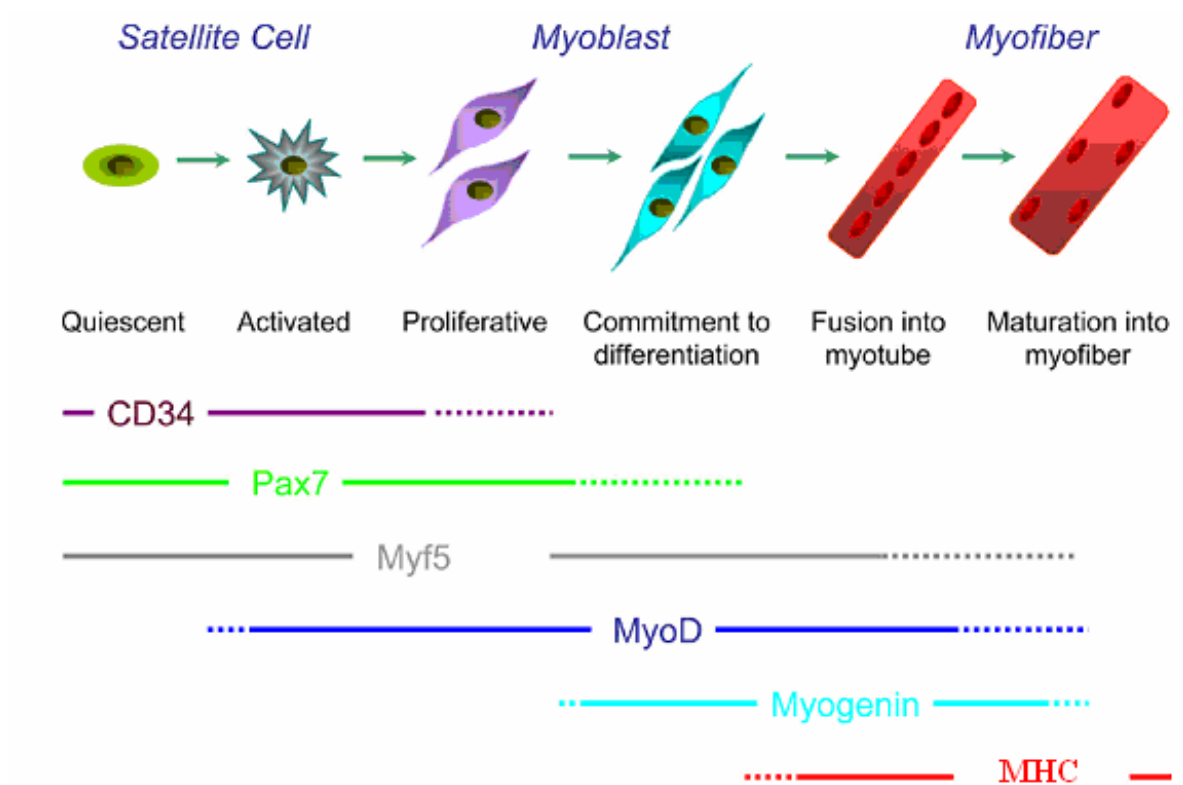
Tiek apoptozės proceso iniciacijoje bei įvykdyme, tiek ir jos išvengime dalyvauja daug signalinių kelių, iš kurių geriausiai charakterizuoti yra mitogenų aktyvuojamų proteinkinazių (MAPK) signaliniai keliai. Nors fiziologiniai MAPK aktyvacijos padariniai atskiriems ląstelių tipams yra skirtingi, tačiau tyrimai rodo, kad išorinio signalo reguliuojama kinazė (ERK) paprastai teigiamai reguliuoja ląstelės proliferaciją ir stabdo apoptozinio signalo perdavimą. Priešingai, c-Jun N-galinė kinazė (JNK) ir p38 MAP kinazės veikimo keliai kai kuriose apoptozės sistemose gali būti laikomi kritiniais, indukuojant apoptozę. Nors mechanizmas, kuriuo JNK ar p38 MAP kinazės indukuoja apoptozę, iki šiol nėra pilnai iširtas, tačiau žinoma, kad šios kinazės veikia reguliuodamos transkripcijos faktorių aktyvumą. Dvi MAPK kinazių kaskados – JNK ir p38 susikerta ties transkripcijos faktoriumi c-Jun [Matsui ir kt., 2001]. Literatūroje yra nedaug duomenų, kaip DNR pažaidos veikia būtent miogenines ląsteles ir kokios signalinės molekulės yra svarbios šių ląstelių išgyvenimui. Taigi, signalinių kelių išaiškinimas būtų rimtas žingsnis sėkmingo citoterapijos taikymo linkme.

1.2. Raumens kamieninių ląstelių diferenciacijos procesas ir jo reguliacija

Diferenciacijos metu mioblastuose vyksta raumenų specifinių genų aktyvacija, ląstelės negrįžtamai išsėina iš ląstelės ciklo. Galutinėje diferenciacijos stadijoje mioblastai susilieja suformuodami daugiabranduoles raumenines ląsteles. Miogenezės procesą reguliuoja MyoD šeimos transkripcijos faktoriai - MyoD, Myf5, miogeninas ir

regulatorinis faktorius-4 kartu su MEF2 (angl. *myocyte enhancer binding factor-2*). MyoD šeimos baltymai (dar vadinami miogeniniais regulatoriniais faktoriais - MRF) pasižymi 80% homologija spiralė-kilpa-spiralė (HLH) motyve. Ši baltymo molekulės dalis reikalinga dimerizacijai ir sąveikai su daugelio raumenims specifinių genų promotoriuose esančia seka CANNTG (E dėžute). MRF rišantis prie konsensinės CANNTG DNR sekos yra aktyvuojama raumenims specifinių genų ekspresija, slopinama ląstelės ciklo progresija ir indukuojama raumenų ląstelių diferenciacija [Kaneko ir kt., 2002]. MyoD, Myf5, Pax7 transkripcijos faktoriai ir baltymas desminas yra ekspresuojami proliferuojančių mioblastų ląstelėse, tuo tarpu miogeninas ir miozino sunkioji grandinė (MHC) yra diferencijuotų raumenų ląstelių markeriai (*1 pav.*) [Asakura ir kt., 2001; Zammit ir kt., 2006;

Bergstrom ir kt., 2001]. Miogeninių ląstelių kultūroje serumo pašalinimo indukuotos diferenciacijos metu vyksta Pax7 ekspresijos slopinimas. Manoma, kad Pax7 gali reguliuoti satelitinių ląstelių dauginimąsi ir atsinaujinimą. Nustatyta, kad Pax^{-/-} raumenyse yra smarkiai sumažėjęs satelitinių ląstelių skaičius. Be to, šis baltymas yra svarbus raumens kamieninių ląstelių miogeniniai specififikacijai. Iš Pax7^{-/-} raumenų išskirti mioblastai neaktyvuojami ir kitų miogeninių ląstelių markerių - transkripcijos faktoriaus MyoD ir desmino [Olguin ir kt., 2004; Zammit, 2004; Oustanina ir kt., 2004]. MyoD transkripcijos metu jungiasi prie DNR homodimerinėje formoje, tačiau stabilesni kompleksai susidaro MyoD heterodimerizuojantis su kitais bHLH baltymais (E2A, E12 ir E47). MyoD aktyvumą neigiamai reguliuoja diferenciacijos inhibitorių (Id) šeimos baltymai, kurių transkripciją skatina mitogenai. Šie baltymai su MyoD arba E12/E47 sudaro neaktyvius prie DNR nesirišančius heterodimerinius kompleksus.



1 pav. Satelitinų ląstelių diferenciacijos stadijos ir miogeniniai markeriai [Zammit ir kt., 2006].

MEF2 transkripcijos faktorių grupę sudaro MADS (MCM1, agamous, deficiens, serum response factor) dėžutės transkripcijos faktoriai. MEF2 baltymų (MEF2A, MEF2B, MEF2C ir MEF2D) homo- arba heterodimerai rišasi prie raumenims specifinių genų promotoriuose esančios konsensinės AT turtingos sekos (MEF2 srities). Miogeniniai bHLH ir MEF faktoriai sinergetiškai aktyvuoja specifinę transkripciją [Zhenguo ir kt., 2000; Jones ir kt., 2004; Cornelison ir kt., 1997]. Padidėjusi miogenino ekspresija ir proteinkinazių inhibitoriaus $p21^{Waf/Cip1}$ indukcija rodo, kad ląstelės yra negrįžtamai išėjusios iš ląstelės ciklo ir pradėjusios diferenciacijos programą [Haotum ir kt., 1998; Guo ir kt., 1995; Hawke ir kt., 2001].

Mioblastams išeinant iš ląstelės ciklo, jų ląstelėse yra slopinama ciklinų ekspresija. Išimtį sudaro ciklinas D3. Miogeninių ląstelių diferenciacijos metu šio

baltymo ekspresija padidėja, tokiu būdu palengvindama išėjimą iš ląstelės ciklo. MyoD transkripcijos faktorius skatina ląstelės ciklo sustabdymą indukuodamas nuo ciklinų priklausomų kinazių (CDK) inhibitorių ekspresiją. CDK inhibitorius p21 kartu su kitais CIP1/KIP1 šeimos baltymais - p57 bei p27 - inhibuoja daugelį nuo ciklinų priklausomų kinazių. Ektopinė p21 ekspresija gali aktyvuoti raumenų genų ekspresiją net esant didelėms serumo koncentracijoms. Be to, yra nustatyta, kad transkripcijos faktorius MyoD padidina ir retinoblastomos baltymo (Rb) ekspresiją. Šis baltymas yra svarbus ląstelės ciklo sustabdymui ir raumenims specifinių genų ekspresijos aktyvacijai. Defosforilintoje formoje Rb jungiasi su transkripcijos faktoriumi E2F ir slopina ląstelės dalijimąsi. Taip pat jis aktyvuoja miogenezės programą reguliuojančius MEF2 faktorius. [Serna, 2001; Berndt, 1999].

Signalai, sąlygojantys satelitinių ląstelių aktyvaciją raumens pažeidimo metu, kol kas nėra pilnai identifikuoti. Buvo nustatyta, kad tirozinkinazės receptoriaus c-met ligandas HGF/SF yra svarbus satelitinių ląstelių aktyvacijai. Kiti mitogenai - EGF, FGF, IGF ir PDGF - skatina mioblastų diferenciaciją, tačiau negali indukuoti satelitinių ląstelių aktyvacijos. Neseniai buvo nustatyta, kad azoto oksidas (NO) gali dalyvauti satelitinių ląstelių aktyvacijoje, indukuodamas HGF/SF išlaisvinimą iš ekstraląstelinio matriksa. Azoto oksido sintetazės 1 (NOS-1) slopinimas susilpnina satelitinių ląstelių aktyvaciją *in vivo*. *In vitro* NO sintetinamas atsakant į fibrilių tempimą, NOS-1 slopinimas redukuoja tempimo metu atpalaiduojamo HGF kiekį. Tačiau kol kas nėra nustatyta kaip NO reguliuoja HGF atpalaidavimą [Anderson, 2000; Tatsumi ir kt; 2002].

Mioblastams diferencijuojantis *in vitro* didelė jų dalis žūsta apoptozės būdu, tačiau galutinai diferencijuotos ląstelės pasižymi didesniu atsparumu įvairiems ląsteliniams stresams. Mioblastų atsparumas apoptozei yra siejamas su CDK inhibitoriaus p21^{WAF1} indukcija ir Rb baltymo hipofosforilinimu [Ostrovsky ir kt., 2003].

Nors ir yra nustatyti įvairūs augimo faktoriai ir hormonai dalyvaujantys raumenų ląstelių augime ir diferenciacijoje, iki šiol trūksta duomenų apie viduląstelinius signalinius kelius, reguliuojančius miogeninių ląstelių proliferacijos ir miogenezės procesus. MAPK signalinių kaskadų vaidmuo miogenezėje yra prieštaringas. Vienu autorių nuomone MAPK signalinis kelias slopina raumenų ląstelių diferenciaciją, tuo tarpu kiti autoriai teigia, kad šis kelias nedalyvauja diferenciacijos proceso reguliacijoje.

Taip pat yra duomenų apie MAP kinazių atliekamą teigiamą vaidmenį miogenezės reguliacijoje [Gredinger ir kt., 1998; Engel ir kt., 2005; Jones ir kt., 2005].

1.3. Apoptozė ir kitos ląstelių mirties formos

Terminas “apoptozė” yra kilęs iš graikų kalbos žodžio, reiškiančio “lapų kritimą”. Tai yra genetiškai kontroliuojamas, energijos reikalaujantis, fiziologinis, evoliucijos eigoje nedaug tepakitęs procesas, svarbus embriogenezėje, ontogenezėje, bręstant imuninės sistemos ląstelėms ir kt. Apoptozė susideda iš kelių nuoseklių etapų: 1) sprendimo fazės, kai vyksta daugybės pro- ir antiapoptozinių, ekstraląstelių ir intraląstelių signalų derinimas; 2) vykdymo fazės, kai yra aktyvinama negrižtama cisteino proteazių (kaspazių) kaskada; 3) apoptozinių kūnelių fagocitavimo fazės.

Apoptozės metu vyksta eilė morfologinių ir biocheminių pokyčių. Būdingas apoptuojančios ląstelės požymis yra branduolio bei pačios ląstelės tūrio sumažėjimas, nes inhibuojama Na^+ , K^+ , Cl^- jonų transporto sistema, skysčiai išteka į išorę. Vyksta ląstelės membranos raukšlėjimasis bei tolygi chromatino kondensacija [Ortiz ir kt., 1996]. Ląstelės paviršius tampa pūslėtas [Sgonc ir kt., 1998]. Branduolio pokyčiai turi vykti santykinai ankstyvoje apoptozės stadijoje, kol yra pakankamai energijos, kad galėtų vykti chromatino kondensacija. Branduolys skyla į atskirus, branduolio membrana apgaubtus fragmentus, kurių viduje yra kondensavęsis chromatinas. Ankstyvoje apoptozės stadijoje fosfatidilserinas, normaliai esantis vidinėje plazminės membranos pusėje, yra translokuojamas į ląstelės išorę. Šio proceso dėka apoptoziniai kūneliai *in vivo* greit atpažįstami ir fagocituojami. Po fagocitozės jie degraduojami lizosomose. *In vitro* apoptoziniai kūneliai išbrinksta ir yra lizuojami. Ši galinė ląstelių žūties fazė *in vitro* vadinama “antrine nekroze”. Plazminė membrana išlieka vientisa iki proceso pabaigos, todėl uždegiminė reakcija nevyksta. *In vivo* ląstelės apoptozė trunka nuo 6 iki 24 valandų, šis laikas priklauso nuo ląstelės tipo [Gabrieli ir kt., 1992].

Ląstelė gali apoptuoti dėl dviejų priežasčių. Pirma, tai gali būti reikalinga normaliam organo ar audinio vystymuisi. Antra, apoptozė gali būti reikalinga sunaikinti tas ląsteles, kurios kelia grėsmę visam organizmui. Pavyzdys gali būti viruso infekuotos ląstelės, kurios yra sunaikinamos sąveikos su citotoksinais T limfocitais pasėkoje.

Pastarieji skatina infekuotas ląsteles apoptuoti. Panašiai apoptozę vykdo ląstelės, turinčios DNR pažeidimų.

Apoptozė skiriasi nuo kitų ląstelės mirties formų. Neapoptozinės mirties pavyzdys yra nekrozė – kai ląstelė miršta išorinio pažeidimo, pavyzdžiui, deguonies trūkumo ar citotoksinių cheminių medžiagų, poveikio pasėkoje. Skirtingai nuo apoptozės, tai pasyvus procesas, kurio metu ląstelė praranda galimybę kontroliuoti jonų transportą, padidėja membranos laidumas, prasideda vandens ir ekstraląstelinių jonų difuzija į ląstelių vidų, sukelianti ląstelės, o ypač mitochondrijų brinkimą. To pasekmė - ląstelės lizė. Žūstančios ląstelės citoplazmos turinys patenka į ekstraląstelinį skystį ir sukelia uždegiminį procesą [Franklin ir kt., 2000]. Branduolyje pokyčiai nežymūs, chromatinas išlieka nepakitęs, vyksta atsitiktinė DNR degradacija. Energija šiuo atveju nereikalinga [Al Rubeai ir kt., 1998;].

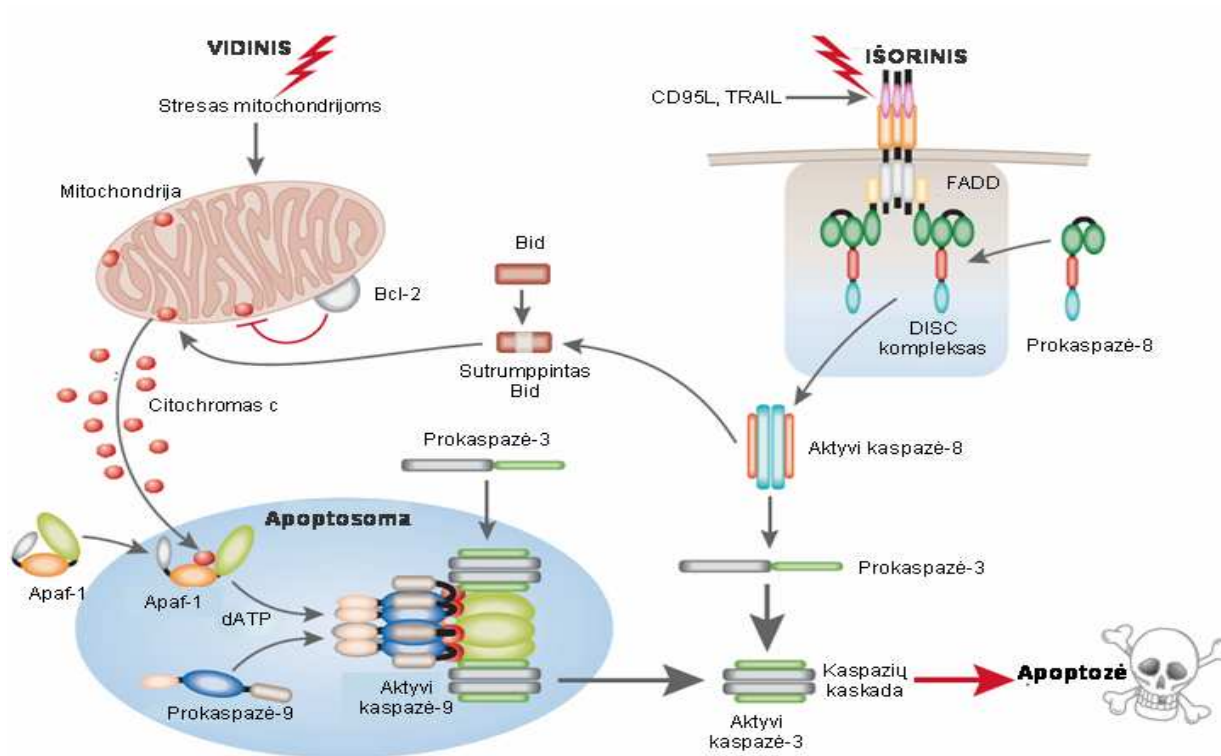
1.4. Apoptozės iniciacija

Apoptozė gali būti sukeliama dviem būdais: per “mirties receptorių” arba nenaudojant “mirties receptorių”. Programuota mirtis vyksta ir ląstelėse, neturinčiose mirties receptorių; šiuo atveju apoptozę gali sukelti hipoksija, hiperemija, acidozė ar kiti metaboliniai veiksniai.

“Mirties programos” vykdytojos kaspazės yra cisteino proteazės, ląstelėje saugomos neaktyvioje būsenoje. Jos atpažįsta keturių amino rūgščių fragmentą ir specifinius substratus skaldo ties asparto rūgštimi, esančia į C-galą nuo atpažįstamo fragmento. Kaspazės skaldo ir inaktyvina baltymus, svarbius ląstelės citoskeleto palaikymui, DNR reparacijai, signalo perdavimui ir ląstelės ciklo kontrolei [Laken ir Leonard, 2001]. Veikiant kaspazėms atsiranda ląstelių struktūros pokyčių, būdingų apoptozei, todėl jos ir vadinamos pagrindinėmis apoptozės vykdytojomis. Eukariotų ląstelėse yra 14 skirtingų kaspazių. Tai yra konstitutyvieji fermentai, kurių kiekis ląstelėje yra pastovus visą jos gyvavimo laikotarpį. Kaspazės 5, 8 ir 9 yra “viršūninės”, kurios, ardydamos kitas prokaspazes, jas aktyvina. Taip susidaro kaspazių aktyvinimo kaskada, stiprinanti apoptozinio signalo perdavimą į mitochondrijas, branduolį ir kitas ląstelių struktūras [Hirata ir kt., 1998; Martin, 1995; Slee, 1999; Bjelakovic ir kt., 2005]. Bcl

šeimos baltymai žinomi, kaip apoptozės reguliatoriai. Viena pagrindinių Bcl-2 baltymų funkcijų yra reguliuoti mitochondrijų membranos vientisumą ir citochromo c (cit c) išlaisvinimą. Šios šeimos baltymai pasižymi dvejopu veikimu: jie gali apoptozę skatinti (Bcl-x_S, Bax, Bid ir Bak) arba slopinti (Bcl-2, Bcl-x_L). Nustatyta, kad Bax homodimerai padidina mitochondrijų membranų laidumą, mitochondrijos išbrinksta, suardomos ir tokiu būdu išlaisvinamas cit c bei kai kurios kaspazės.

Apoptozinio signalo perdavime skiriami du keliai – vidinis ir išorinis (2 pav.). DNR pažaidos, hipoksija, oksidacinis stresas, augimo veiksnių stygius indukuoja vidinį apoptozės signalų perdavimo kelią, kuris įtraukia mitochondrijas. Iš mitochondrijų išlaisvintas cit c jungiasi su apoptozę aktyvinačiu faktoriumi-1 (Apaf-1). To pasėkoje aktyvinama kaspazė-9. Apaf-1, cit c ir kaspazė-9 sudaro kompleksą – apoptosomą, kuri aktyvina kaspazę-3 [Franklin ir kt., 2000]. Išorinis kelias prasideda nuo receptorių, kuriuos dažniausiai aktyvina navikų nekrozės veiksnys (TNF) ar Fas ligandas. Ligando prisirišimas prie šių receptorių sukelia jų trimerizaciją ir mirties domenų adaptorinių molekulių - FADD ir TRADD (su Fas ar TNF- α receptoriumi asocijuoti mirties domenai) pritraukimą. Taip susiformuoja mirtį indukuojantis signalo perdavimo kompleksas – DISC. Šio komplekso formavimasis pritraukia „iniciatorinę“ kaspazę – kaspazę-8. Kaspazės-8 aktyvinama autoproteolizės būdu. Aktyvi kaspazė-8 skaldo ir aktyvina kitą, „egzekucinę“ kaspazę-3. Abu iniciatorinių kaspazių (-8 ir -9) aktyvacijos keliai susitinka efektorinės kaspazės-3 aktyvacijos taške. Ši kaspazė būtina daugelio charakteringų branduolio pokyčių atsiradimui: chromatino kondensacijai, DNR fragmentacijai, taip pat lemia kitų apoptozės požymių atsiradimą [Laken ir Leonard, 2001; Kam ir Ferch, 2000; Green, 1998].

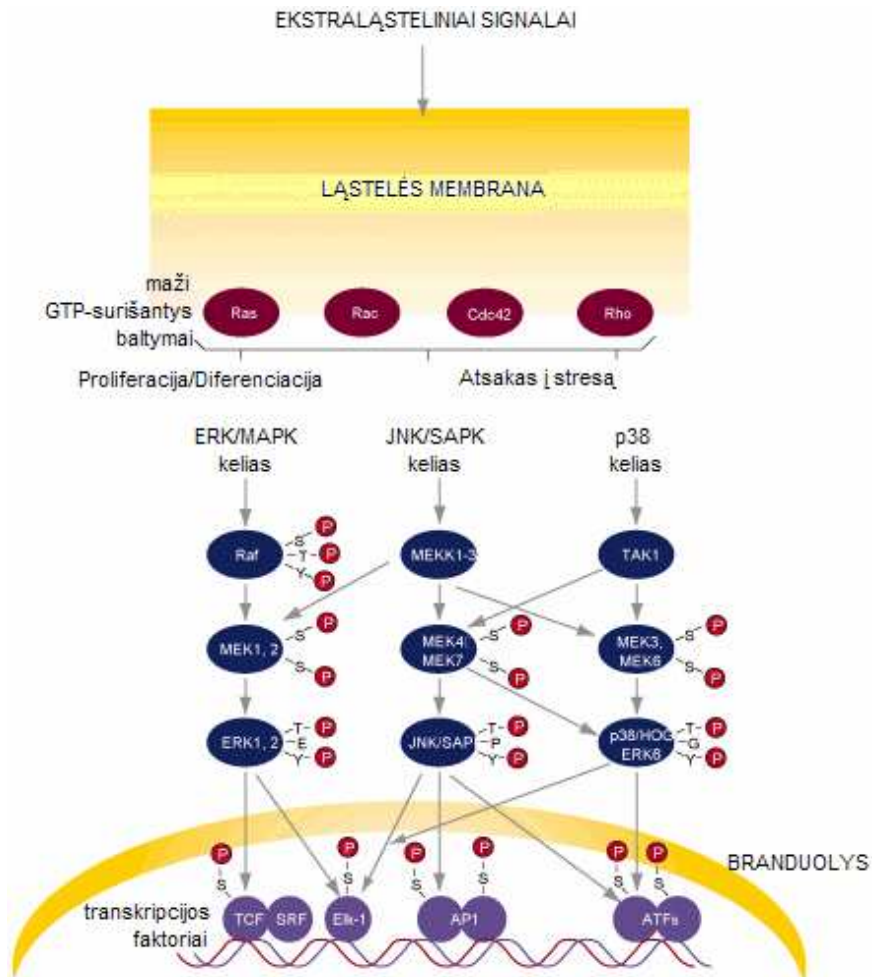


2 pav. Vidinis ir išorinis ląstelės apoptozės keliai. TRAIL ir CD95L - navikų nekrozės faktoriaus receptorių ligandai, DISC – mirtį indukuojantis signalo perdavimo kompleksas, FADD – su Fas receptoriumi asocijuotas mirties domenas [MacFerlane M ir kt., 2004].

1.5. MAPK signalo perdavimo kelias

Žinduolių ląstelėms atsakant į ekstraląstelinius poveikius, ląstelėje yra įjungiamas biocheminių įvykių kaskada, kuri perduoda informaciją nuo ląstelės paviršiaus receptorių į branduolio transkripcijos aparatą. To pasekoje kinta specifinių transkripcijos faktorių aktyvumas, aktyvinama arba slopinama tam tikrų genų raiška. Vieni ekstraląsteliniai signalai skatina ląstelės augimą ir dalijimąsi, tuo tarpu kiti indukuoja diferenciaciją arba programuotą ląstelių žūtį - apoptozę [Minden ir kt., 1997]. Eukariotinėse ląstelėse vienas pagrindinių signalų perdavimo kelių yra mitogenų aktyvinamų proteinkinazių (MAPK) signalo perdavimo kelias. Geriausiai yra ištirtas signalo perdavimo kelias, kurį sudaro trijų MAP kinazių kaskada. Įvairūs faktoriai – augimo faktoriai, citokinai,

protoonkogenai ir kt. aktyvina mažą GTP surišančią baltymą Ras, kuris, savo ruožtu, aktyvina Ser/Thr kinazę Raf (MAPKKK). Ši kinazė toliau fosforilina ir aktyvina MAPK kinazę (MEK). MEK fosforilina ir aktyvina MAPK [Guan, 1994; Edmunds ir kt., 2004]. Žinduolių ląstelėse randamos mažiausiai keturios MAPK grupės (3 pav.):



3 pav. MAP kinazių signalo perdavimo keliai [Bruce ir kt., 1997].

ekstraląstelinio signalo reguliuojama proteinkinazė (ERK1/2), c-Jun N-galinė kinazė (JNK1/2/3), p38 (p38 α / β / γ / δ) ir ERK5. MAP kinazės yra labai konservatyvios serino/treonino kinazės. Jos fosforilina ir reguliuoja daugelį ląstelės baltymų - augimo faktorių receptorių, transkripcijos faktorių, citoskeleto baltymų, fosfolipazės ir kt. Visoms MAP kinazėms būdinga tai, kad jos aktyvinamos fosforilinant Thr-X-Tyr motyvą (X = Glu ERK, Pro – JNK ir Gly – p38 MAPK) [Hommes ir kt., 2003; Chuang ir kt.,

2000; Davis 2000]. ERK kaskadą aktyvina augimo faktoriai, ji yra svarbi ląstelių proliferacijai. JNK ir p38 signalinius kelius stimuluoja genotoksinės medžiagos ir citokinai. Jie lemia atsaką į stresą, dėl to yra stabdomas ląstelių augimas ir inicijuojamas apoptozės procesas. Tačiau, yra duomenų, kad skirtingose ląstelių linijose, šios MAP kinazės gali pasižymėti skirtingomis funkcijomis. Pavyzdžiui, ERK skatina neuronų, raumenų ir T ląstelių diferenciaciją, o fibroblastuose ji dalyvauja mitogeninių signalų perdavime. Streso aktyvinamos JNK ir p38 MAPK gali lemti ląstelių išgyvenimą, transformaciją, proliferaciją bei pasižymėti anticitotoksiniu, antiapoptoziniu veikimu. Literatūros duomenimis, laikina ERK aktyvacija lemia proliferaciją, tuo tarpu pastovi - sąlygoja ląstelių augimo sustabdymą ir diferenciaciją. Laikina JNK ir p38 indukcija lemia ląstelių išgyvenimą, o pastovi – apoptozę [Chuang ir kt., 2000].

1.5.1. ERK 1/2 MAP kinazės

ERK1 ir ERK2 yra atitinkamai 44 ir 42 kDa dydžio baltymai, pasižymintys 85% homologija. Dvi fosfoakceptorijų vietos, tirozinas ir treoninas, yra atskirtos glutamo liekana, aktyvinimo kilpoje sudarydamos TEY motyvą [Payne DM ir kt., 1991]. Abi formos yra plačiai paplitusios, nors jų santykinė raiška atskiruose audiniuose skiriasi. ERK yra aktyvinamos plataus spektro ligandų bei įvairių ląstelinių pokyčių [Lewis ir kt., 1998]. Pavyzdžiui, fibroblastuose juos aktyvina serumas, augimo faktoriai, citokinai, stresas, su G baltymais susijusių receptorių ligandai bei transformuojantys augimo faktoriai. ERK1/2 aktyvina MEK1/2. Pastarąsias fosforilina MEKK c-Raf, o šį reguliuoja augimo faktorių receptoriai ir tirozino kinazės, perduodančios signalą per Ras. Translokuotos į branduolį, ERK, priklausomai nuo stimulo, fosforilina įvairius substratus: transkripcijos aktyvintojus p90 ir S6, kinazes RSK ir MSK, MAPKAP-K1 (MAPK aktyvinta baltymų kinazė-1), fosfolipazę A₂, transkripcijos faktorius Elk-1, Ets1, Sap1a, Myc, STAT, adaptorius Sos, augimo faktorių bei estrogenų receptorius [Denhardt ir kt., 1996]. ERK signalinio kelio aktyvinimas yra svarbus ląstelių dalijimuisi, migracijai, ląstelės skeleto reorganizacijai, diferenciacijai ir išgyvenimui, tačiau yra duomenų, kad ERK dalyvauja streso atsake bei ląstelės žūties procese [Werlen ir kt., 2003].

ERK baltymai gali būti aktyvinti kelių signalinių kelių. ERK aktyvinimo mechanizmų įvairovę apsprendžia daugybė G klasės baltymų, kai kurių receptorių gebėjimas aktyvinti daugiau nei vieną G baltymų klasę bei specifiniai ląsteliniai mechanizmai. Vienas iš G baltymų signalo perdavimo būdų yra sąlygojamas cAMP kiekio padidėjimo. Nuo cAMP priklausoma baltymų kinazė A (PKA) gali fosforilinti Rap1a, kuris, aktyvindamas B-Raf, teigiamai veikia ERK. Kitas būdas - kai Src šeimos kinazės yra aktyvinamos PI3K kelio. Pastarosios toliau gali fosforilinti tirozino kinazinius receptorių, baltymus PYK2, FAK, taip sukurdamos rišimosi vietas adaptoriniams baltymams. Toliau formuojasi baltyminiai kompleksai, aktyvinantys Ras ir Raf1 [Dikic ir kt., 1996]. Egzistuoja dar vienas kelias, kur G baltymo efektorius PLC aktyvina PKC, o ši – Raf1.

Ko gero labiausiai ištirtas ERK aktyvinantis kelias, prasidedantis receptoriais, pasižymintiais tirozino kinazinėmis savybėmis. Ligandui stimuliuojant receptorių, didėja pastarojo katalitinis aktyvumas, vyksta tirozino liekanų autofosforilinimas. Toliau formuojasi baltyminiai kompleksai, kurių sudėtis sąlygoja tolimesnius įvykius. Prie receptoriaus fosforilintų tirozino liekanų per savo SH2 domenus jungiasi adaptoriniai baltymai Shc ir Grb2. Toliau prie susidariusio komplekso jungiasi guanino nukleotidų keitimo faktorius (GEF) Sos. Jis jau gali aktyvinti Ras, pakeisdamas GDP į GTP. Ras-GTP sąveikauja su įvairiais efektoriais, taip pat ir su Raf1. Ras sąveika su Raf1 indukuoja Raf1 konformacinius pokyčius, kurie didina jo kinazinį aktyvumą. Raf1 lokalizacija prie membranos sudaro sąlygas kitoms kinazėms (Src, PKC) toliau modifikuoti Raf1 ir didinti jo aktyvumą. Raf1 aktyvumo padidėjimas indukuoja MEK-ERK modulį [Chaudhary ir kt., 2000].

1.5.2. JNK MAP kinazės signalo perdavimo kelias

JNK MAP kinazės aktyvina įvairūs išoriniai poveikiai – UV spinduliuotė, uždegiminiai citokinai, tam tikri mitogenai. JNK yra aktyvinama kinazių kaskados, kurią sudaro mitogenų aktyvinama ekstraląstelinio atsako kinazė 1 (MEKK 1) ir mitogenų aktyvinamos proteinkinazės 7 ir 4 (MKK7/4). Pastarosios kinazės aktyvina JNK fosforilindamos, Thr183 ir Thr185 *in vivo* ir *in vitro*. Be JNK, MKK4 taip pat fosforilina

ir aktyvina p38 MAPK. Toks MKK4 specifiskumas aktyvinti šias dvi MAP kinazes apsprendžia jų suderintą veikimą, atsakant į aplinkos ar citokinų poveikį. Tačiau tai stebima ne visais atvejais. Pavyzdžiui, JNK aktyvacija kepenyse koreliuoja su sumažėjusiu p38 MAP kinazės aktyvumu. MKK7 dažniausiai yra aktyvinama citokinų (TNF, IL-1), o MKK4 - aplinkos stresų [Minden ir kt., 1997; Tournier ir kt., 1997].

JNK proteinkinazes koduoja trys genai: *jnk-1*, *jnk-2* ir *jnk-3*. *jnk-1* ir *jnk-2* genai yra plačiai ekspresuojami daugelyje audinių, tuo tarpu *jnk-3* – daugiausia neuronų audinyje ir širdies miocituose. Vykstant alternatyviam splaisingui susidaro 10 JNK izoformų. Aktyvintos JNK fosforilina transkripcijos faktorius c-Jun, JunD ir ATF2, kurie dalyvauja AP-1 komplekso formavime ir aktyvacijoje. Šių faktorių fosforilinimas padidina jų transkripcinį aktyvumą.

Naujesniais duomenimis, priklausomai nuo ląstelių rūšies ir poveikio stiprumo, JNK vaidmuo gali būti proapoptozinis, antiapoptozinis arba neutralus. Vienas iš galimų JNK taikinių yra vėžio supresorius p53. Sąveika su JNK destabilizuoja p53 ir skatina jo degradaciją. Tačiau streso paveiktose ląstelėse, aktyvios JNK fosforilina p53 ir apsaugo jį nuo degradacijos. Kiti eksperimentai parodo, kad JNK gali dalyvauti c-Myc stimuliuotoje apoptozėje. Nesant JNK, sutrinka apoptozės iniciacija mitochondrinu keliu, susilpnėja cit c išlaisvinimas. Potencialūs JNK taikiniai, kurie gali reguliuoti cit c išlaisvinimą, priklauso Bcl2 grupės baltymams. JNK fosforilina Bcl2 bei Bcl-x_L ir tokiu būdu inhibuoja jų antiapoptozinę funkciją [Soh ir kt., 2003; Dunn ir kt., 2002]. Daugelis citokinų (pvz. TNF) lemia tik laikiną JNK aktyvaciją, kuri nesukelia apoptozės [Davis, 2000]. Yra duomenų, kad c-Jun, esant stresui, aktyvina tam tikrus DNR reparacijos genus ir tokiu būdu lemia ląstelių išgyvenimą esant DNR pažeidimui [Dunn ir kt., 2002].

Nustatyta, kad JNK1 ir JNK2 atlieka skirtingas funkcijas ląstelių proliferacijos reguliacijoje. *jnk1*^{-/-} fibroblastams ir eritroblastams yra būdingas sumažėjęs fosforilinto c-Jun ir ciklino D1 lygis bei proliferacijos defektai. *jnk2*^{-/-} ląstelėms, atvirkščiai, yra būdingas padidėjęs proliferacijos, fosforilinto c-Jun ir ciklino D1 lygis. Tokiu būdu, JNK1 yra teigiamas ląstelių proliferacijos reguliatorius, reikalingas c-Jun fosforilinimui ir aktyvacijai, o JNK2 neigiamai reguliuoja c-Jun stabilumą ir proliferaciją. Neaktyvios JNK2 pasižymi didesniu giminingumu c-Jun, todėl nestimuliuotose ląstelėse dauguma c-Jun molekulių yra susirišusios su JNK2, bet c-Jun nėra fosforilinamas. Tyrimai *in vitro*

neparodė ryškių JNK1 ir JNK2 kinazinio aktyvumo skirtumų. Abi šios formos gali fosforilinti c-Jun bei kitus taikinius [Sabapathy, 2004].

Nustatyta, JNK MAPK signalo perdavimo kelias yra aktyvuotas kai kurių rūšių vėžinėse ląstelėse. Tai rodo, kad šis signalo perdavimo kelias yra svarbus kancerogenezės proceso raidai. Be to, buvo nustatyta, kad JNK yra svarbios imuninio atsako reguliavime. Pelės, neturinčios JNK1 ir JNK2, yra morfologiškai normalios, tačiau, dėl sutrikusios T ląstelių funkcijos, joms yra būdingi imuninio atsako defektai [Bennett, 2001].

Identifikuoti keturi neigiamai JNK reguliuojantys faktoriai: MAP kinazių fosfatazė MKP7, šiluminio šoko baltymas Hsp72, onkoproteinas Evi 1 ir azoto oksidas [Hommes ir kt., 2003].

1.5.3. p38 MAP kinazės

p38 MAP kinazių šeima pirmiausiai buvo identifikuota kaip lipopolisacharidų (LPS) aktyvinamos kinazės. Šiuo metu yra žinomos keturios p38 kinazių izoformos: p38 α , p38 β , p38 γ (arba ERK6, SAPK3) ir p38 δ (SAPK4). p38 α yra ekspresuojama daugelyje audinių ir yra geriausiai apibūdinta. p38 γ daugiausia ekspresuojama skeleto raumenyse, o p38 δ - plaučiuose, inkstuose, sėklidėse ir kasoje. Literatūros duomenimis, įvairios p38 izoformos atlieka skirtingas funkcijas. Daugumoje uždegiminių ląstelių p38 α yra pagrindinė aktyvuota izoforma. p38 MAP kinazės aktyvina dvigubo specifiškumo MAP kinazių kinazės (MKK3/4/6/7), fosforilinančios Thr-Gly-Tyr motyvą, būdingą visoms p38 MAP kinazėms. Nustatyta, kad skirtingos MAPK kinazės selektyviai aktyvina skirtingas p38 izoformas [Ono ir kt., 2000; Enselen ir kt., 1997].

p38 MAP kinazės signalo perdavimo kelią gali aktyvinti įvairūs ekstraląsteliniai stimulai: citokinai (IL-1, IL2, IL7, IL17, IL18, TGF- β , TNF- α), įvairūs patogenai, augimo faktoriai, šilumos šokas, UV spinduliuotė, deguonies radikalai ir kt. p38 MAP kinazės reguliuoja ląstelių proliferaciją, diferenciaciją ir apoptozę. Nustatyta apie 100 genų, kuriuos reguliuoja p38 signalo perdavimo kelias. Potencialūs p38 kinazių taikiniai yra MNK1 ir MAPKAP2 (MK2), kuris savo ruožtu fosforilina ir aktyvina Hsp25 bei Hsp27, keletą transkripcijos faktorių - ATF-2, ATF-1, MEF-2, STAT1, ELK-1, CHOP ir Max/Myc. p38 taip pat lemia NF κ B aktyvaciją. [Hommes, 2002; Rincon, 1998].

Nustatyta, kad priklausomai nuo ląstelių rūšies ir poveikio stiprumo, p38 kinazė gali skirtingai reguliuoti ląstelių proliferaciją bei išgyvenimą. G₁ ir S fazių riboje, p38 MAPK aktyvacija gali skatinti arba slopinti slinktį ląstelės ciklu. Nustatyta, kad perėjimui iš G₀ į G₁ fazę reikalinga p38 inhibicija [Ambrosino ir kt., 2001]. Manoma, kad p38α teigiamai reguliuoja vienas ląstelės ciklo stadijas, o neigiamai veikia kitas [Ono ir kt., 1999].

Literatūros duomenimis, aktyvi p38 lemia programuotą diferencijuotų PC12 ląstelių žūtį, bet apsaugo žiurkių pirminius kardiomiocitus nuo anizomicino indukuotos apoptozės. Kaspazių inhibitoriai gali slopinti p38 aktyvaciją.

Nesenai buvo nustatyta, kad p38 kinazė atlieka svarbų vaidmenį įvairių ląstelių diferenciacijos procese. p38α ir p38β yra reikalingos 3T3-L1 fibroblastų diferenciacijai į adipocitus ir PC12 ląstelių diferenciacijai į neuronus. p38 inhibitorius SB203580 blokuoja šių ląstelių diferenciaciją [Ono ir kt., 2000].

1.5.4. MAP kinazių vaidmuo širdies ląstelių apoptozės reguliacijoje

Apoptozė - fiziologinė, genetiškai užprogramuota ląstelių žūtis, plačiai tiriamas reiškinys tiek sveikame organizme, tiek ir įvairių ligų atvejais. Pastaruoju metu intensyviai vykdomi tyrimai siekiant išsiaiškinti ląstelių žūtį sąlygojančius molekulinis mechanizmus pažeistoje širdyje bei identifikuoti apoptozę reguliuojančius kelius, specifinius širdies ląstelėms. Apoptozės mechanizmų reguliacijos išaiškinimas leistų patobulinti kardiomioplastijos metodą bei pritaikyti naujas širdies ligų gydymo strategijas. Įvairūs tyrimai rodo MAP kinazių aktyvinimą patologiniame širdies židinyje. Tačiau iki šiol neaišku, kokį vaidmenį atlieka MAP kinazių kaskadų aktyvinimas širdyje patologinio proceso metu.

ERK MAP kinazės vaidmuo širdyje. Nustatyta, kad išemijos/reperfuzijos, oksidacinio streso ir hipoksijos metu kardiomiocituose vyksta ERK MAPK aktyvinimas. Įvairių tyrimų duomenimis MEK-ERK kelias apsaugo ląsteles nuo apoptozės. Žinoma, kad insulino augimo faktorių (IGF-1), kardiostrofiną, serotoniną ir katecholaminų apsauginis efektas kardiomiocituose yra susijęs su ERK signalinio kelio aktyvinimu, tuo tarpu kai MEK-ERK slopinimas padidina ląstelių apoptozę daunorubicinu paveiktoje

širdies miocitų kultūroje. Be to, yra nustatyta, kad skilvelio miocituose per β_1 -adrenerginį receptorių perduodami apoptoziniai signalai yra susiję su ERK1/2 slopinimu, tuo tarpu kai β_2 -adrenerginio receptoriaus sąlygotas ląstelių išgyvenimas yra susijęs su ERK1/2 aktyvinimu. Apsauginis ERK1/2 vaidmuo yra nustatytas ir H_2O_2 bei lipopolisacharidais paveiktoje kardiomiocitų kultūroje.

Apsauginį ERK signalinio kelio vaidmenį patvirtina ir kardiomiocitų apoptozės tyrimai *in vivo*. Transgeninėms pelėms, kurių širdyje pastoviai ekspresuojamos aktyvios MEK formos, yra būdingas didesnis atsparumas infarktui, lyginant su laukinio tipo pelėmis.

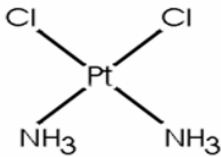
Tačiau šiuo metu trūksta duomenų apie tiesioginius ERK MAP kinazės apsauginius mechanizmus. Nustatyta, kad širdies miocituose ciklooksigenazė-2 (COX-2) ir ANF yra vieni iš galimų ERK apsauginių signalų perdavimo mediatorių. Kitas ERK1/2 anti-apoptozinio veikimo mechanizmas yra siejamas su ERK gebėjimu sąveikauti su PKC ϵ . Mitochondrijose ERK1/2 formuoja kompleksą su PKC ϵ ir palengvina proapoptozinio Bcl-2 šeimos baltymo Bad fosforilinimą ir inaktyvaciją. Literatūros duomenimis, ERK1/2 tiesiogiai fosforilina RSK (angl. *p90 ribosomal S6 kinases*), kuri, savo ruožtu, tiesiogiai fosforilina ir inaktyvina BAD ir padidina ląstelės gyvybingumą. Neseniai buvo nustatyta, kad ERK tiesiogiai fosforilindama proapoptozinį BimEL faktorių, padidina jo degradaciją ir apsaugo ląstelę nuo apoptozės. Be to, ERK1/2 aktyvinimas stabdo kaspazės-8 skaldymą ir tokiu būdu slopina išorinį apoptozės kelią. Genetiškai modifikuotų pelių tyrimai rodo, kad tiesioginė šio kelio aktyvacija gali turėti gydomąjį efektą sergant įvairiomis kardiomiopatijos formomis ir ūmaus miokardo infarkto atveju [Baines ir kt., 2004].

JNK MAP kinazės vaidmuo širdyje. Įvairūs stresai (hiperosmotinis šokas, hipoksija/reoksigenacija, baltymų sintezės inhibitoriai (pvz. anizomicinas), reaktyvūs deguonies junginiai (ROS) ir uždegiminiai citokinai) aktyvina JNK MAP kinazę širdies miocitų kultūroje. Tačiau šio kelio vaidmuo kardiomiocituose yra prieštaringas. Įvairių tyrimų duomenimis širdies miocituose JNK MAP kinazė atlieka tiek pro-, tiek ir antiapoptozinį vaidmenį. Pavyzdžiui, tyrimuose su azoto oksidu (NO) buvo nustatytas antiapoptozinis šio kelio vaidmuo. Tačiau, daugumoje eksperimentinių modelių dominuoja proapoptozinis JNK veikimas. Nustatyta, kad kardiomiocituose oksidacinio

streso metu aktyvinta JNK fosforilina mitochondrinius baltymus ir sukelia proapoptozinių molekulių - citochromo c ir AIF - atpalaidavimą. Be to, yra nustatyta, kad JNK fosforilina ir inaktyvina antiapoptozinius Bcl-2 ir Bcl-x_L baltymus. Yra duomenų, kad JNK1 slopinimas išemijos sąlygomis apsaugo ląsteles nuo apoptozės, tuo tarpu kai JNK2 slopinimas neturi reikšmės ląstelių išgyvenimui [Aoki ir kt., 2002; Baines ir kt., 2004]. Tokį prieštaringą JNK MAP kinazės vaidmenį miocituose gali paaiškinti skirtingas eksperimentų modeliavimas ir ląstelių specifiškumas. Be to, yra žinoma, kad aktyvios JNK ląstelėje fosforilina įvairius baltymus, iš kurių vieni sąlygoja apoptozę, tuo tarpu kiti yra atsakingi už ląstelių išgyvenimą. Kadangi dauguma eksperimentinių tyrimų liudija apie proapoptozinį JNK kelio vaidmenį *in vivo*, tikėtina, kad šio kelio farmakologinis slopinimas miokarde galėtų turėti gydomąjį efektą ūmių širdies pažeidimų sąlygomis [Dougherty ir kt., 2002; Andreka ir kt., 2000; Kaiser ir kt., 2005; He ir kt., 1999].

p38 MAP kinazės vaidmuo širdyje. Širdies ląstelėse yra ekspresuojamos α -, γ - ir δ -p38 MAP kinazės izoformos, tačiau nėra patikimų įrodymų apie β -p38 MAPK ekspresiją [Schulz ir kt., 2003]. p38 MAP kinazės, kaip ir vaidmuo širdies miocituose yra prieštaringas. Yra duomenų tiek apie apsauginį, tiek ir apie proapoptozinį p38 kelio vaidmenį kardiomiocituose. Nustatyta, kad širdies miocitų kultūroje farmakologinis p38 MAP kinazės slopinimas sumažina išemijos ir doksorubicino indukuotą apoptozę. Kitų tyrimų duomenimis širdies miocituose aktyvinta p38 MAP kinazė translokuojasi į mitochondrijas, kur tiesiogiai fosforilina ir inaktyvuoja antiapoptozinį Bcl-2 baltymą. Be to, p38 aktyvinimas yra susijęs su kaspazės-3 skaldymu. Įvairūs farmakologiniai (panaudojant šio kelio inhibitorius) bei genetiniai tyrimai *in vivo* taip pat patvirtina proapoptozinį šio kelio veikimą. Kitų autorių duomenimis, p38 MAPK aktyvinimas širdies miocituose gali turėti ir apsauginį efektą. Tai gali būti siejama su apsauginio šaperono α -B-kristalino fosforiliniu. Tokius skirtingus tyrimų rezultatus galėtų paaiškinti tai, kad p38 MAP kinazė, priklausomai nuo ląstelių tipo, poveikio ir kitų signalinių kelių įtakos, gali pasižymėti tiek pro- tiek ir antiapoptoziniu veikimu.

1.6. Kardiotoksinės medžiagos – veikimo mechanizmas ir pagrindiniai taikiniai ląstelėje



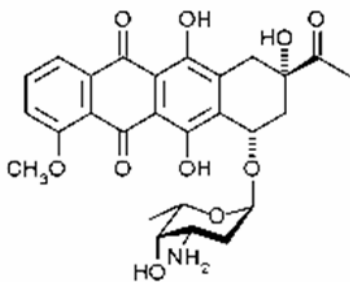
4 pav. Cisplatinos struktūra.

Cisplatin (cis-diaminodichloroplatina, cis-DDP) naudojama vėžio gydymui daugiau nei 25 metai, bet biocheminis mechanizmas iki šiol nėra aiškus. Šio junginio citotoksiškumas pasireiškia jam jungiantis prie branduolio DNR ir sutrikdant transkripcijos ir/arba replikacijos procesus.

Cisplatin yra labai efektyvi gydant kai kuriuos navikus, bet didžiausia problema yra tai, kad ji sukelia sunkius pašalinius efektus, o kai kurie navikai yra jai atsparūs. Apie 90% cisplatinos kraujyje susiriša su plazmos baltymais, tokiu būdu didelė vaisto dalis yra inaktyvinama. Branduolio DNR yra pagrindinis šios medžiagos biologinis taikynys. Cisplatin gali rištis prie fosfolipidų (pvz. fosfatidilserino membranoje), taip pat prie mikrofilamentų, peptidų, RNR. Su DNR cisplatin sudaro struktūriškai skirtingas sąryšas. Paskaičiuota, kad 60-65% sąryšių susiformuoja tarp grandinių, 20-25% - toje pačioje grandinėje. Taip pat yra DNR-cisplatin-baltymas sąryšių tipas.

I. Sanchez-Perez su bendradarbiais nagrinėjo kitą platinos darinį – trans-DDP, kuris 20 kartų mažiau toksiškas nei cisplatin [Sanchez-Perez ir kt., 1998]. Šis junginys nesudaro tipišku cis-alkilantiems junginiams 1,2-1,3 d(purinas-fosfatas-purinas) DNR aduktų, kurie, manoma, trukdo replikacijai ir nurašymui. Tačiau, naudojant tirozino fosfatazių inhibitorių ortovanadatą, buvo pasiektas toks citotoksinis efektas kaip ir cisplatinos. Fenomenas buvo paaiškintas prailgintu JNK aktyvumu, kurį, nepavojingos trans-DDP pažaidos atveju turi numalšinti MAPK fosfatazės, tačiau inhibuotos to neatlieka. Taigi, ne pažaida, o kryptingas signalo transformavimas lemia ląstelės žūtį.

Nors apoptozė ir nekrozė yra dvi skirtingos ląstelės mirties formos, kartais paveiktos cisplatinos vienos populiacijos ląstelės gali žūti ir apoptozės, ir nekrozės būdu. Kokiu keliu nueis ląstelė, lemia ląstelės būklė, pvz., ATP kiekis ląstelėje [Fuertes ir kt., 2003].



5 pav. Daunorubicino struktūra.

Daunorubicinas pasižymi gebėjimu įsiterpti į DNR, padidinti lipidinių membranų pralaidumą jonams ir generuoti laisvus radikalus ląstelių viduje. Yra nustatyta, kad daunorubicinas neigiamai veikia širdies raumenį ir yra kardiotoksiškas. 1 μM dozės poveikis yra pakankamas, kad sukeltų tam tikrus struktūrinius pokyčius miokarde [Zbinden ir kt., 1978; Zhu ir kt.,

1999]. Veikiant daunorubicinui, ląstelės gali žūti dvejopai - nekrozės ir apoptozės būdu [Lim ir kt., 2004; Sawyer ir kt., 1999]. Daugybė tyrimų leido identifikuoti signalinius kelius, atsakančius į daunorubicino poveikį eukariotinėje ląstelėje: svingomielinazę, MAP streso aktyvinamą kinazę JNK, transkripcijos veiksnių NF- κ B, TNF bei jo receptorių. Jau žinoma, kad šie keliai yra įtakojami kai kurių lipidinių molekulių, reaktyvių deguonies darinių, taip pat dalies onkogenų, baltymų kinazių bei išorinių veiksnių [Laurent ir Jaffr  zou, 2001]. Buvo parodyta, kad galima sėkmingai blokuoti šių signalinių kelių apoptozinį veikimą [Siminiak ir kt., 2004]. Daunorubicino sukeltai naujagimių žiurkių širdies miocitų apoptozei kultūroje yra reikalingas p38, o ERK veikia antiapoptoziniskai [Zhu ir kt., 1999]. Kumar ir bendradarbių apžvalgoje apibendrinama, kad miocitų apoptozės eigoje Akt aktyvumas gali arba mažėti, arba nekisti, o MAP kinazės aktyviai dalyvauja tiek apoptozėje, tiek ląstelių išgyvenime po daunorubicino poveikio [Kumar ir kt., 2002].

NOC-18 (dietilentriamin/azoto oksidas, DETA/NO) - oksidacinį stresą širdyje imituojanti medžiaga - yra gryno azoto monoksido donoro pavyzdys. NO organizme atlieka dvi pagrindines funkcijas – mažos jo koncentracijos, susidarę pastoviai veikiant NO sintazei, atlieka signalinės molekulės vaidmenį, o didelės NO koncentracijos, veikiant indukuojamai NO sintazei (iNOS) yra citotoksinės. Širdyje mažos NO koncentracijos gali veikti kraujagysles atpalaiduojančiai ir širdies susitraukimus stimuliuojančiai, o didelės koncentracijos susilpnina širdies susitraukimus. Manoma, kad NO yra vienas iš išemijos indukcijos faktorių, tačiau mažos NO ar iNOS koncentracijos gali slopinti išemijos sukeltą širdies ląstelių žūtį. Iš kitos pusės, NO gali sukelti apoptozę

ir net nekrozę, kurių mechanizmai dar nėra visiškai išaiškinti [Arstall ir kt., 1999]. NO, kaip apoptozės induktoriaus, veikimas greičiausiai pasireiškia reaguojant su mitochondriniais superoksido radikalais, todėl atsiranda vidinių ląstelės komponentų pažaidos, sąlygojančios apoptozės iniciaciją. Duomenys apie įvairių signalinių molekulių vaidmenį NO indukuotos ląstelių žūties reguliacijoje yra prieštaringi. Yra žinoma, kad ERK1/2 aktyvinimas, padidėjus NO koncentracijai širdies miocituose, gali būti apsauginis arba neutralus, priklausomai nuo ląstelių rūšies ir stresą sukeliančio faktoriaus. JNK ir p38 MAPK aktyvinimas oksidacinio streso metu gali ir apsaugoti, ir paskatinti miocitų žuvimą [Andreka ir kt., 2004; Choukroun ir kt., 1999].

1. 7. MAP kinazių inhibitoriai, jų veikimo principai

ERK kelio inhibitorius UO126 yra flavoninis junginys, sukurtas Alan Saltiel ir Parke-Davis kompanijoje. Tai labai savitas ERK kelio inhibitorius, kuris jungiasi prie neaktyvios MKK1/MEK1, taip sutrukdydamas jos aktyvinimą c-Raf'u ir kitais aukštesniaisiais aktyvintojais. Junginys efektyvus net esant labai mažoms koncentracijoms ir nesąveikauja nei su jau aktyvinta MKK1, nei su kitomis kinazėmis. Nors MKK2 homologija su MKK1 yra net 90%, PD98059 pasižymi dešimt kartų didesniu giminingumu MKK1, o kadangi daugelyje ląstelių linijų MKK1 yra dominuojantis ERK aktyvintojas, MKK1 inhibicija beveik visiškai blokuoja ERK1/2 aktyvinimą [Alessi ir kt., 1995].

p38 inhibitorius SB203580 priklauso naujai klasei piridinil imidazolų, kurie buvo susintetinti siekiant nuslopinti interleukino-1 (IL-1) ir TNF raišką monocituose po bakterijų lipopolisacharidų (LPS) poveikio. Jis pasižymi mažu toksiškumu *in vivo* ir gali efektyviai slopinti uždegiminiuosius procesus. SB203580 slopina SAPK2a/p38 ir SAPK2b/p38β, bet neinhibuoja kitų baltymų kinazių, tokių kaip ERK1/2, JNK1, SAPK4. SB203580 rišasi p38 (ir prie aktyvaus, ir prie neaktyvaus fermento) ATP kišenėje. Nors buvo parodyta, kad SB203580 gali slopinti JNK2 alternatyvaus splaisingo formas, jo giminingumas šiems baltymams yra 10-20 kartų mažesnis, negu p38 MAPK.

JNK kinazės inhibitorius SP600125 yra veiksmingas, selektyvus grįžtamo veikimo JNK 1/2/3 izoformų inhibitorius. Slopinimas vyksta konkuruojant dėl susirišimo su ATP. Jo giminingumas JNK yra 300 kartų didesnis negu ERK ir p38 MAP kinazėms. Be to, šis inhibitorius slopina c-Jun fosforilinimą, blokuoja IL-2, TNF- α raišką ir IL-1 indukuotą fosfo-Jun kaupimąsi bei c-Jun transkripciją.

2. DARBO METODAI

2.1. Pirminių miogeninių ląstelių auginimas *in vitro*

Pirminės miogeninių ląstelių linijos buvo gautos iš triušių skersaruožių raumenų. Ląstelės auginamos Iskovo modifikuotoje Dalbeko terpėje (IMDM, Sigma), praturtintoje 10% fetaliniu veršelio serumu bei antibiotikais - 100 vnt/ml penicilino ir 100µg/ml streptomicino (proliferacijos terpė). Ląstelės auginamos 37 °C termostate, esant 5% CO₂, formuoja monosluoksnį. Morfolginis kultivuojamų ląstelių tapatumas vertintas šviesiniu mikroskopu pagal būdingą šių ląstelių verpstės formą.

2.2. Ląstelių diferenciacija

Ląstelės išsėjamos 40 000 ląstelių/ml tankumu proliferacijos terpėje. Prilipus ląstelėms prie substrato (tai trunka maždaug 24 val.), pašalinama proliferacijos terpė, ląstelės du kartus plaunamos fosfatiniu buferiu (FB: 80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl), po to keturias dienas auginamos diferenciacijos terpėje: Dalbeko terpė (DMEM) su antibiotikais, praturtinta 2 % arklio serumo.

2.3. Gyvybingumo įvertinimas tripano mėlio testu

Ląstelių gyvybingumas vertintas tripano mėliu (0,4% tripano mėlio tirpalas, paruoštas FB), lygiomis dalimis jį sumaišant su ląstelių suspensija. Skaičiuota šviesiniu mikroskopu, naudojant Gorjajevo kamerą. Metodas pagrįstas dažo patekimu į negyvas ląsteles – negyvos ląstelės dažosi mėlyna spalva.

2.4. Imunofluorocitocheminis metodas

Ląstelės augintos 30 mm skersmens Petri lėkštelėse su dengiamaisiais stikliukais ant dugno proliferacijos terpėje. Ląstelės išsėtos 40 000 ląstelių/ml tankumu, po paros auginimo fiksuotos lediniu acetonu:metanolio, 1:1 tirpalu 10 min, plautos FB, blokuotos 1 % JSA/FB tirpalu 1 val., veiktos pirminiais pelės monokloniniais antikūnais prieš desminą (“Sigma”, 340 µg /ml, 1 % JSA/FB tirpale) 60 min., 37 °C. Ląstelės plautos FB ir inkubuotos su Alexa 488-ožkos prieš pelės Fab fragmentą antikūnais (“Molecular Probes”, 10 µg/ml 1 % JSA/FB/ožkos serumo tirpale) 30 min., 37 °C. Ląstelės dar kartą plautos FB. Dengiamieji stikliukai dedami ant objektinių stikliukų, vertinama fluorescenciniu mikroskopu (stebima žalia fluorescencija).

2.5. Imunocitochemija su antikūnais konjuguotais su šarmine fosfataze

Ląstelės augintos 30 mm skersmens Petri lėkštelėse su dugne esančiais dengiamaisiais stikliukais proliferacijos arba diferenciacijos terpėje. Ląstelės išsėtos 40 000 ląstelių/ml tankumu, po paros auginimo fiksuotos acetono:metanolio (1:1) tirpalu 10 min., plautos TBST tirpalu (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.2 % Tween-20, pH 8.0), blokuotos 1 % JSA/FB tirpalu 1 val., dar kartą plautos TBST tirpalu ir inkubuotos su monokloniniais antikūnais prieš miozino sunkiąsias grandines (skersaruožių raumenų), sujungtais su šarmine fosfataze (1:100, 0.05 M Tris buferyje, pH 8.0, su 1 % BSA, 1 mM MgCl₂, 50 % glicerolio ir 0.1 % NaN₃) 2 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos stikliukai plauti TBST tirpalu ir inkubuoti su chromoforo tirpalu (1 % BCIP DMF-e, 1.5 % NBT DMF-e, 50 mM levamizolio vandenyje) 30 –60 min. kambario temperatūroje.

2.6. Ląstelių dažymas kristalvioletu

Ląstelės fiksuojamos prieš tai pašalinus auginimo terpę. Fiksuojama ir dažoma 0,1% kristalvioletu, kurio tirpalas paruošiamas 20% etilo spirite. 1 cm² imama 100 µl paruošto tirpalo, eksponuojama 30 minučių. Po to ląstelės plaunamos 3 kartus vandeniu,

džiovinamos, vertinama šviesiniu mikroskopu. Metodas paremtas nespecifiniu baltymų dažymu.

2.7. Ląstelių dažymas azuro-eozino dažais (pagal Romanovskį)

Apoptozinių ir gyvų ląstelių nustatymas šviesiniu mikroskopu yra paremtas skirtinga ląstelės branduolio ir citoplazmos morfologija jas nudažius baziniais ir rūgštiniais dažais. Eozinas yra rūgštinis dažas, dažantis bazinius ląstelės komponentus tokius kaip hemoglobinas, tam tikras citoplazmines granules (dažo rausvai). Rūgštinius ląstelės komponentus, pvz. branduolio DNR, dažo bazinis dažas azuras (dažo mėlynai violetine spalva). Taigi, ląstelės citoplazma dažosi šviesia rausva/rožine spalva, o branduolys tamsesne violetine/mėlyna spalva. Apoptozinėse ląstelėse, palyginus jas su normaliomis ar nekrozinėmis, stebimos membranos pūslelės, citoplazmos ir ląstelės tūrio sumažėjimas, stipriai kondensuotas chromatinas, branduolio susitraukimas. Branduolys dažnai piknotinis ar fragmentuotas (stiprus dažymasis, tamsiai violetinė spalva), stebimi apoptoziniai kūneliai. Nekrozinėse ląstelėse branduolys “pabrinkęs”, išdidėjęs.

Ląstelės centrifuguojamos (1000 aps./min., 5-10 min.), terpė nusiurbama Pastero pipete. Ant ląstelių nuosėdų užpilamas atšaldytas ląstelių fiksavimo tirpalas (metanolis/ledinė acto rūgštis (LAR) (3:1). Laikoma šaldytuve kelias valandas ar paras. Procedūra kartojama. Po fiksavimo ląstelės centrifuguojamos, nusiurbiamas fiksavimo tirpalas (paliekamas tik lašas). Ląstelės Pastero pipetės ir kriaušės pagalba išpurškiamos ant švirių atšaldytų objektinių stiklų. Likęs metanolis pašalinamas spiritinės lempelės liepsnoje, LAR nupučiama, preparatai išdžiovinami.

2.8. Ląstelių lizavimas

Ląstelės lizuojamos lizės buferiu: 10Mm TrisHCl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM NaF; 0,1%BSA; 1% Triton X-100. Pieš buferio naudojimą pridedama 20 µg/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄. Tirpalo pH turi būti 7,2. Milijonui ląstelių imamas 0,5 ml lizės buferio. Laikoma lede 20 min., po to centrifuguojama 0-4°C 20 000 g 15 min. Supernatantas lygiomis dalimis sumaišomas su pavyzdžio buferiu. Baltymai denatūruojami inkubuojant 5 min. verdančiame vandenyje.

Pavyzdžio buferiui sumaišoma 2,5 ml 4xTrisHCl/natrio dodecilsulfato buferio (NDS) pH 6,8; 2 ml glicerolio; 0,2 ml β-merkaptoetanolio; 0,1 mg bromfenolio mėlio dažo ir pripilama dejonizuoto vandens iki 10 ml. Laikoma -20°C temperatūroje.

2.9. Baltymų elektroforezė

Paruošiami tirpalai:

1. 4x Akrilamido/Bis-akrilamido tirpalas: 30% akrilamido; 0,8% bis-akrilamido.
100 ml tirpalo reikia 30 g akrilamido ir 0,8 g bis-akrilamido.
2. 4x TrisHCl/NDS tirpalas: 1,5 M TrisHCl, pH 8,8; 0,4% NDS.
500 ml tirpalo reikia 91 g Tris bazinio, 2 g NDS, 300 ml bidestiliuoto vandens. 1N HCl nustatoma tirpalo pH 8,8 ir pripilama vandens iki 500 ml, filtruojama per 0,45 μm porų dydžio filtrą. Laikoma 4°C temperatūroje.
3. 4x TrisHCl/NDS tirpalas: 0,5 M TrisHCl, pH 6,8; 0,4%NDS.
Į 80 ml bedestiliuoto vandens pridedama 12,1 g Tris bazinio; 0,8 g NDS. 1N HCl nustatoma tirpalo pH 6,8 ir pripilama vandens iki 200 ml. Filtruojama ir laikoma 4 °C temperatūroje.
4. 4x elektrodinis buferis.
5000 ml buferio reikia 15,1 g Tris bazinio, 72 g glicino, 5 g NDS. Buferio pH 8,3.
5. 10% (NH₄)₂S₂O₈(AP) – 1ml.
6. Tetrametiletildiaminas (TEMED).

10% skiriamąjo gelio 10 ml gamybai imama: Akiril/Bis - 3,3 ml; 4x TrisHCl/NDS pH 8,8 - 2,5 ml; H₂O – 4,2 ml; AP – 100 μl; TEMED – 15,6 μl. Viskas gerai sumaišoma ir polimerinama poliakrilamido gelio paruošimo gerdeleje. Kad poliakrilamido gelio paviršius būtų lygus, prieš polimerizaciją užsluoksniuojama butanolio, kuris po polimerizacijos nupilamas ir plaunama destiliuotu vandeniu.

4% koncentruojamojo gelio 5,08 ml gamybai imama: Akril/Bis – 0,65 ml; 4x TrisHCl/NDS pH 6,8 – 1,27 ml; H₂O – 3,1 ml; AP - 50 µl; TEMED – 10 µl. Gerai išmaišoma ir užpilama ant skiriamąjo 10% poliakrilamido gelio paviršiaus. Įdedamos “šukos”. Geliui susipolimerinus, “šukos” atsargiai išimamos.

Į elektroforezės aparatą pripilame elektrodinio buferio. Į “kišenėles” įnešama po 30 µl paruoštų ląstelių lizatų. Įjungiamo elektros srovė. Srovės stiprumas padidinamas, kai bromfenolio mėlio dažas įeina į skiriamąjį gelį. Kai bromfenolio mėlio dažas pasiekia skiriamąjo gelio pabaigą, srovė išjungiamo.

2.10. Imunoblotingas

Baltymai iš poliakrilamidinio gelio pernešami ant PVDF membranos. Tuo tikslu gelis dedamas ant membranos, iš abiejų pusių uždedama po 4 sluoksnius vatmano ir suspaudžiama. Dedama į pernešimo aparatą, pilamas pernešimo buferis (500 ml buferio reikia: 1,5 g Tris bazinio; 7,2 g glicino; 100 ml metanolio; 0,5 g NDS ir vandens iki 500 ml). Įjungiamo 80 mA/h srovė, laikoma 2,5 val.

Po pernešimo membranos merkiamos į “bloto” tirpalą (5% neriebaus pieno milteliai; 0,05% Tween 20; 0,01% NaN₃) ir laikoma 1 val. Išėmus iš šio tirpalo plaunama plovimo tirpalu (10mM TrisHCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,1% Tween 20) 3 kartus po 5 min. Tada paveikiama pirminiais antikūnais ir inkubuojama 4° C temperatūroje per naktį. Po to nusiurbus pirminius antikūnus, plaunama plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Tada užpilami antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze, ir vėl inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos plaunama 3 kartus po 5 min. plovimo tirpalu. Imunoblotas išryškintas ECL (sustiprinta chemoluminiscencija) metodu.

Imunoblotingas atliktas pagal *Amersham pharmacia Biotech* protokolą.

2.11. Baltymo kiekio nustatymas Bradford metodu

Metodas pagrįstas specifine baltymo sąveika su dažu Kumasi brilliantinio mėliu ir susidariusios komplekso koncentracijos matavimu spektrofotometriškai, esant 595 nm bangos ilgiui.

Kalibracinės tiesės sudarymas: į 6 mėgintuvėlius pilama po 0, 1, 2, 5, 10, 15 ir 20 µl 1 mg/ml jaučio serumo albumino (Sigma-Aldrich) tirpalo bei distiliuoto vandens iki 1 ml. Tada į visus mėgintuvėlius pilama po 500 µl Bradford reagento. Mėginiai skubiai sumaišomi. Po 15-20 min. optinis tankis matuojamas spektrofotometru, esant bangos ilgiui 595 nm. Remiantis optinio tankio reikšmėmis brėžiamas grafikas – šviesos sugerties priklausomybė nuo baltymo priklausomybės. Gaunama kalibracinė baltymų kiekio nustatymo tiesė.

Nežinomos baltymo koncentracijos matavimas: Imama 1-5 µl tiriamojo baltymo tirpalo, pripilama H₂O iki 1 ml ir atliekamos visos anksčiau parašytos operacijos. Gautieji rezultatai lyginami su kalibracine tiese.

2.12. Naudotos medžiagos

Apoptozės tyrimuose buvo naudotos priešvėžinės genotoksinės/chemoterapinės medžiagos - cisplatina (pagrindinis tirpalas - 1 mg/ml, vandeniniame druskų tirpale), daunorubicinas (0,5 mM, vandeniniame druskų tirpale) bei kardiotoksiškumą imituojanti medžiaga - NO donoras - NOC-18 (1M, vandenyje), (Sigma).

MAP kinazių aktyvumo tyrimuose naudoti antikūnai prieš: fosfo-JNK (BD Biosciences); fosfo-p38 (New England Biolabs); p38 (Transduction Laboratories); Cx43 (Zymed laboratories, Invitrogen). Kiti naudoti antikūnai – polikloniniai antikūnai prieš mioziną (MHC) (anti-myosin fast, Sigma), monokloniniai antikūnai prieš desminą (Sigma) ir miogeniną D1 (Gene Tex. Inc., USA). Antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze (Cell Signaling Technologies) arba šarmine fosfataze ir fluoresceinu (Sigma). Darbe naudoti signalinių molekulių inhibitoriai - UO126, SP600125, SB203580 (Promega, Calbiochem, BIOSOURCE).

2.13. Statistinė rezultatų analizė

Statistiniai vidurkiai ir pasikliautinieji intervalai buvo apskaičiuoti naudojant kompiuterinę programą *Microsoft Excel*.

3. Rezultatai ir jų aptarimas

Magistrinis darbas yra projekto, skirto suaugusio organizmo kamieninių (miogeninių) ląstelių išgyvenimo ir žūties patologiniame židinyje mechanizmų tyrimui bei stresui atsparių genetiškai modifikuotų ląstelių kūrimui, dalis. Galutinis projekto tikslas – to paties suaugusio organizmo kamieninių ląstelių transplantavimas į pažeistą širdį. Ląstelių gyvybingumas transplantavimo procese yra aktualus praktiniu ir teoriniu aspektu, nes mioblastus tiek *in vitro*, tiek ir *in vivo* veikia įvairūs stresai. Ląstelių žūtis/išgyvenimo keliai yra potencialūs gydymo taikiniai tobulinant kardiomioplastijos metodą.

Magistrinio darbo metu buvo siekiama charakterizuoti iš suaugusio triušio raumens gautas kamieninių ląstelių linijas, įvertinti ląstelių jautrumą apoptozės induktoriams ir identifikuoti signalinius kelius, reguliuojančius šių ląstelių žūtį bei išgyvenimą, ląstelėms atsakant į įvairius stresinius poveikius jų proliferacijos ir diferenciacijos metu. Apoptozei indukuoti buvo naudojamos kardiotoksiniu veikimu pasižymėjęs genotoksinės medžiagos – cisplatina ir daunorubicinas, bei oksidacinį stresą širdyje imituojanti medžiaga - fiziologinio apoptozės induktoriaus - azoto oksido donoras NOC-18. Šiame darbe tyrimai buvo atliekami su 25-40 pasažų Mio26 ląstelių linija. Ląstelių diferenciacija buvo vykdoma keturias paras, kontrolei naudojant tokį pat laiką nediferencijuojančioje terpėje augančias ląsteles (toliau vadinama kontaktuojančiomis ląstelėmis/kontaktinio augimo kultūra).

3.1. Miogeninių ląstelių charakterizavimas ir specifinių diferenciacijos markerių nustatymas

Mūsų tiriamos iš triušio raumens išskirtos kamieninės ląstelės (Mio26) pasižymėjo neribotu dauginimosi potencialu – ląstelės *in vitro* dauginosi daugiau nei metus (virš 100 pasažų) [Bukelskiene ir kt., 2005]. Neribotas dauginimasis kultūroje yra kamieninių ląstelių savybė.

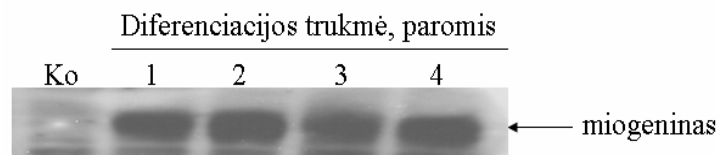
Pastarųjų metų darbai, atlikti įvairiose pasaulio laboratorijose, parodė, kad raumenyje be raumeninės kilmės kamieninių ląstelių yra ir kitos kamieninių ląstelių

populiacijos: šalutinės populiacijos ląstelės, su skeleto raumenų kraujagyslėmis asocijavę pericitai, o taip pat kamieninės ląstelės, atklydusios iš kitų organų (pvz. hemapoetinės kamieninės ląstelės) [Asakura ir kt., 2001]. Neseni darbai parodė raumeninės kilmės kamieninių ląstelių plastiškumą. Iš skeleto raumens išskirtos kamieninės ląstelės yra daugiagalės ir turi potencialą diferencijuotis ne tik į miocitus, bet ir į lygiųjų raumenų ląsteles, o taip pat į kitas mezenchiminės linijos ląsteles – osteocitus ar adipocitus [Asakura ir kt., 2002]. Priklausomai nuo diferenciaciją indukuojančio signalo ląstelės-pirmtakai gali pasirinkti skirtingą galutinės diferenciacijos kelią. Manoma, kad šiose kamieninėse ląstelėse gali būti indukuota daugelio ląstelių likimą sąlygojančių (determinuojančių) genų, kurių dėka jos tampa daugiaverčiais pirmtakais (“multiblastais”), raiška. Nustatyta, kad *in vitro* skeleto raumens satelitinių ląstelių virtimas į kitas, pvz. mezenchiminės diferenciacijos ląsteles, gali būti ir atsitiktinis procesas, tuo tarpu kai *in vivo* tai gali įvykti nesant pakankamai miogeninių signalų [Dellavalle ir kt., 2007; Inagawa-Ogashiwa ir kt., 2002].

Magistrinio darbo pirmoje dalyje mes siekėme nustatyti mūsų tiriamų ląstelių prigimtį bei tyrėme šių ląstelių gebėjimą diferencijuotis miogeninių ląstelių kryptimi. Mūsų gauti duomenys rodo, kad iš raumens gautų linijų ląstelės turi desmino baltymą, auginant ląsteles diferenciacijos terpėje (DT) jose nustatyta miozino sunkiųjų grandinių raiška. Be to, diferenciacijos metu kultūroje atsiranda daugiabranduolių ląstelių: ląstelės turinčios 2 ir daugiau branduolių po 4 parų DT sudaro 15 – 30 procentų. (6 pav.).

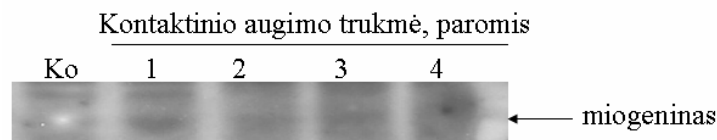
6 pav. Kamieninių miogeninių ląstelių identifikavimas: Ilgalaikis ląstelių auginimas kultūroje nekeitė desmino raiškos (A); diferenciacijos terpėje po 72 val. šios ląstelės diferencijuojasi į raumenines daugiabranduoles ląsteles (E, F), kurios ekspresuoja miozino sunkiąją grandinę (MHC) (B). Tose pačiose ląstelėse, augintose proliferacijos (nediferencijuojančioje) terpėje, MHC raiška neregistruota (C). D – kontrolinės ląstelės, visą tyrimo laiką augintos proliferacijos terpėje (dažyta kristalvioletu dažu). Desmino ir MHC raiška tirta panaudojus antikūnus prieš šias molekules; daugiabranduolės ląstelės buvo nustatytos citologiniuose preparatuose, prieš tai jas atkabinus nuo substrato tripsinu (F) bei dažant ląsteles kristalvioletu *in situ* (E). (žr. Metodų skyriuje).

Transkripcijos faktorius miogeninas yra diferenciacijos programą pradėjusių kamieninių miogeninių ląstelių baltymas - žymuo. Jis indukuojamas ankstyvose diferenciacijos stadijose ir yra reikalingas kitų miogenezės procesą reguliuojančių genų ekspresijai [Kaneko ir kt., 2002]. Mūsų tyrimai parodė miogenino indukciją jau pirmą ląstelių augimo diferenciacijos terpėje parą. Ląstelėms diferencijuojant ilgesnį laiką (iki 96 val. (4 paras) miogenino raiška beveik nekito (7 pav.).



7 pav. Miogenino raiška Mio26 ląstelėse, augintose diferenciacijos terpėje (DMEM + 2% arklio serumo). Ko – kontrolinės ląstelės (24 val., po išsėjimo), augintos proliferacijos terpėje (IMDM + 10% FBS).

Literatūros duomenimis, tarp kontaktuojančių raumens kamieninių ląstelių *in vitro* gali vykti spontaniškas diferenciacija. Todėl miogenino raišką tyrėme ir kontaktiniu būdu proliferacijos terpėje augančiose Mio26 ląstelėse (8 pav.).



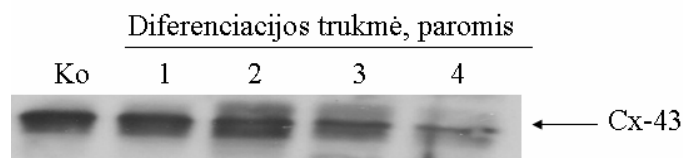
8 pav. Miogenino raiška kontaktinėse, proliferacijos terpėje (IMDM + 10% FBS) augintose Mio26 ląstelėse. Ko – kontrolinės ląstelės (24 val. po išsėjimo), augintos proliferacijos terpėje.

Taigi, kontaktinio augimo metu, proliferacijos terpėje keturių parų bėgyje augančių ląstelių kultūroje, miogenino indukcija nevyksta. Matyt, šiuo atveju, proliferacijos terpėje spontaniškai diferencijuojasi tik labai nedidelė ląstelių dalis, o tai neleidžia nustatyti specifinio diferenciacijos baltymo – miogenino.

Tyrimų metu nustatyta desmino ekspresija įrodo miogeninę Mio26 ląstelių prigimtį, o specifiniai diferenciacijos markeriai ir morfologiniai požymiai parodo, kad ląstelės *in vitro* gali diferencijuotis raumeninių ląstelių linkme: jose indukuojama miogenino bei sunkiųjų miozino grandinių raiška, dalis ląstelių susilieja ir formuoja

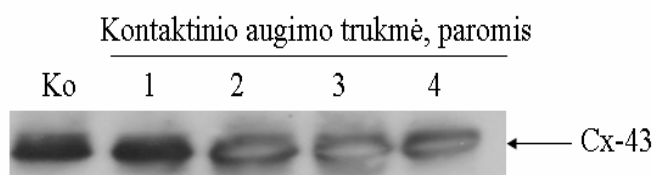
daugiabranduoles, du ir daugiau branduolių turinčias, ląsteles (6 ir 7 pav.). Taigi, iš suaugusio triušio raumens gautos ląstelės, galinčios neribotą laiką proliferuoti *in vitro*, pasižymi sugebėjimu diferencijuotis į raumenines ląsteles.

Normalioms audinių funkcijoms yra svarbios tarpląstelinės įvairių formų sąveikos. Viena iš šių ląstelių tarpusavio sąveikos formų yra plyšinės jungtys. Yra gerai žinoma, kad ląstelių sąveika per plyšines jungtis yra reikalinga proliferacijai bei diferenciacijai [Mesnil ir kt., 1995; Yamasaki ir kt., 1996]. Tarpląstelinė komunikacija tarp persodintų mioblastų bei šeimininko kardiomiocitų yra svarbi problema nulemianti transplantuotų ląstelių funkcionalumą. Plyšinės jungtis sudaro koneksiniais vadinami baltymai. Literatūroje yra duomenų, kad koneksino 43 (Cx43) geno transfekcija į mioblastus padidina tarpląstelių plyšinių kontaktų kiekį, o kartu ir transplantuotų ląstelių funkcionalumą – sinchroninį susitraukinėjimą, greitesnę diferenciaciją. Mūsų tyrimų metu nustatėme, kad iš triušio raumens išskirtos kamieninės ląstelės turi koneksino Cx43 baltymą, kurio kiekis mažėja ląstelių miogeninės diferenciacijos metu (9 pav.).



9 pav. Koneksino (Cx43) raiška Mio26 ląstelėse, auginiose diferenciacijos terpėje (DMEM + 2% arklio serumo). Ko – kontrolinės ląstelės (24 val., po išsėjimo), auginios proliferacijos terpėje (IMDM + 10% FBS).

Tokie patys tyrimai buvo atlikti ir kontaktiniu būdu proliferacijos terpėje augančių Mio 26 ląstelių kultūroje. Šiuo atveju, taip pat nustatėme Cx43 baltymo raiškos mažėjimą, tačiau jis nebuvo toks ryškus kaip Mio26 ląstelių diferenciacijos metu (10 pav.).



10 pav. Koneksino (Cx-43) raiška kontaktinėse, proliferacijos terpėje (IMDM + 10% FBS) augintose Mio26 ląstelėse. Ko – kontrolinės ląstelės (24 val., po išsėjimo), augintos proliferacijos terpėje.

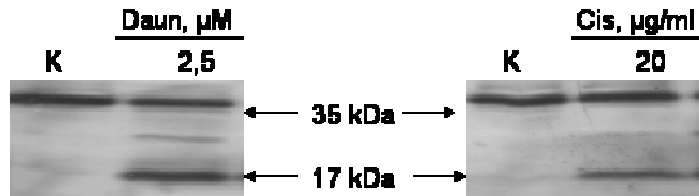
Gauti rezultatai apie koneksino Cx43 raiškos sumažėjimą raumeninės kilmės kamieninėse ląstelėse atitinka literatūros duomenis apie ryšio tarp šeimininko širdies ląstelių bei transplantuotų miogeninių ląstelių nebuvimą po pastarųjų diferenciacijos į miocitus [Kaneko ir kt., 2002]. Manome, kad egzogeninio Cx43 įvedimas į transplantuojamas ląsteles galėtų pagerinti elektrinį ryšį tarp transplantuotų ir širdies miocitų. Mūsų pradiniai duomenys rodo, kad transfekuoto Cx43 raiška ląstelių miogeninės diferenciacijos metu nesikeičia.

3.2. Miogeninių ląstelių žūties tyrimai po genotoksinių medžiagų poveikio, ląstelių diferenciacijos, proliferacijos ir kontaktnio augimo metu.

Šioje darbo dalyje siekėme įvertinti miogeninių ląstelių jautrumą apoptozės induktoriams ląstelių diferenciacijos bei proliferacijos metu. Apoptozei indukuoti buvo naudojamos kardiotoksiniu veikimu pasižyminčios genotoksinės medžiagos – cisplatina (5 – 20 $\mu\text{g/ml}$) ir daunorubicinas (2 μM), bei oksidacinį stresą širdyje imituojanti medžiaga - fiziologinio apoptozės induktoriaus - azoto oksido donoras NOC-18 (1,5 – 5 mM).

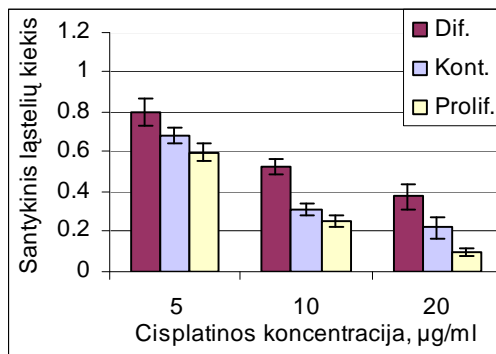
Pradžioje nustatėme ląstelių žūties formą. Gauti duomenys parodė, kad po visų trijų tirtų medžiagų poveikio, Mio26 ląstelės žūsta apoptozės būdu. Apoptozines ląsteles nustatėme po cisplatinos (10-20 $\mu\text{g/ml}$) poveikio 24 valandų. Nekrozinės ląstelės cisplatina poveiktoje populiacijoje sudarė nedidelę dalį ir nedaug skyrėsi nuo kontrolės. Tuo tarpu, didesnės daunorubicino bei NOC- 18 koncentracijos sukėlė nekrozinę ląstelių žūtį (duomenys nepateikiami). Apoptozinis ląstelių žūties pobūdis buvo patvirtintas morfologiniais apoptozės kriterijais bei kaspazės-3 skaldymu (11 ir 12 pav.).

11 pav. Proliferuojančių ląstelių morfologija kontroliniuose (A) ir cisplatina (15 $\mu\text{g/ml}$, 24 val.) veiktuose (B) preparatuose. (Citologinių preparatų paruošimą žr. Metodų skyriuje.)

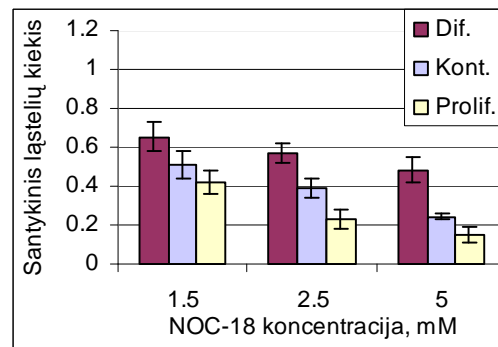


12 pav. Kaspazės-3 skaldymas po daunorubicino (Daun) ir cispalinos (Cis) poveikio. K – kontrolinės, genotoksinėmis medžiagomis neveiktos, ląstelės. Tiriamomis medžiagomis ląstelės buvo veiktos 24 valandas.

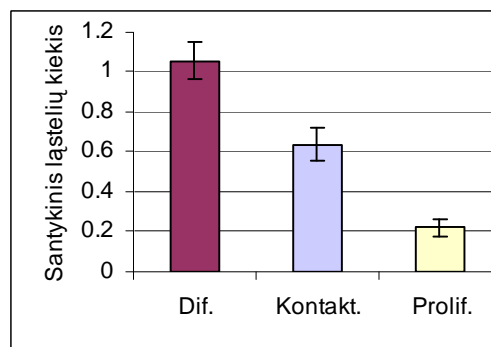
Siekiant įvertinti miogeninių ląstelių jautrumą apoptozės induktoriams ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir kontaktnio augimo metu, ląstelės buvo veikiamos įvairiomis cispalinos (13 pav., A) ir NOC-18 (13 pav., B) koncentracijomis. Jautrumas daunorubicinui buvo tirtas naudojant vieną – 2 µM koncentraciją (13 pav., C).



A



B



C

■ - kontaktuojančios ląstelės; ■ - diferencijuojančios ląstelės;
■ - proliferuojančios ląstelės

13 pav. Kontaktinių, diferencijuotų ir proliferuojančių ląstelių gyvybingumas po genotoksinių medžiagų - cisplatinos (A), NOC-18 (B) ir daunorubicino (C) - poveikių. Poveikio trukmė – 24 val. Prieš poveikį diferencijuojančios ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2% arklio serumo). Lygiagrečiai tokį pat laiką kultūroje buvo auginamos kontaktuojančios ląstelės. Proliferuojančios ląstelės buvo veikiamos kitą dieną po jų išsėjimo. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis ± standartinis nuokrypis.

Gauti rezultatai rodo, kad miogeninės ląstelės diferenciacijos metu tampa atsparesnės apoptozės induktoriams lyginant su kontaktuojančiomis ir proliferuojančiomis ląstelėmis. Tačiau kontaktinis augimas taip pat lemia didesnę (nei proliferuojančių ląstelių) ląstelių atsparumą minėtoms medžiagoms. Duomenų apie diferencijuojančių miogeninių ląstelių atsparumą programuotą ląstelių žūtį sukeliantiems veiksniams sutinkama ir literatūroje. Didesnis mioblastų atsparumas apoptozei yra siejamas su CDK inhibitoriaus p21^{WAF1} indukcija ir Rb baltymo hipofosforiliniu [Ostrovsky ir kt., 2003].

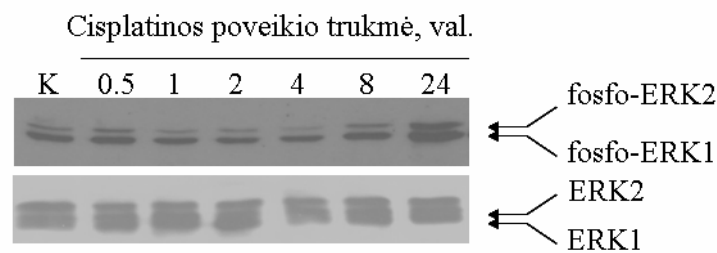
3.3. Miogeninių ląstelių išgyvenimo/žūties procesuose dalyvaujančių MAP kinazių tyrimas ląstelių diferenciacijos ir kontaktinio augimo metu

Žinome, kad transplantuotos į pažeistą audinį kamieninės ląstelės po trumpos, kelias paras trunkančios, proliferacijos fazės diferencijuojasi į audiniui specifines ląsteles. Biochemijos institute anksčiau buvo tirtas įvairių signalinių molekulių, tarp jų ir MAPK, vaidmuo proliferuojančių *in vitro* ląstelių žūties reguliacijoje, paveikus jas įvairiais apoptozės induktoriais. Šiame darbe mes tyrėme diferencijuotų kamieninių miogeninių ląstelių žūties reguliavimo mechanizmus. Tyrimuose naudojome tokias apoptozės induktorių koncentracijas, kurios po 24 poveikio valandų paprastai sukelia 20 – 60 % ląstelių žūtį. Tyrimai buvo atliekami su diferencijuotomis Mio26 linijos ląstelėmis. Diferenciacija inicijuota 4 paras šias ląsteles auginant diferenciacijos terpėje. Tokios diferencijuotos ląstelės (po 4 parų) buvo veiktos tiriamomis medžiagomis – cisplatina, daunorubicinu ir NOC-18. Kontrolinės ląstelės tą patį laiką buvo auginamos proliferacijos terpėje. Jei diferencijuojančių ląstelių dauginimasis po paros sustodavo, tai proliferacijos terpėje ląstelės nustodavo daugintis tik atsiradus glaudiems kontaktams tarp ląstelių. Kurį laiką kultūroje iki bandymo pradžios jos būdavo kontaktinio stabdymo būsenoje. Todėl šią populiaciją pavadino kontaktinėmis ląstelėmis. Kai kuriuose eksperimentuose lygiagrečiai atlikome bandymus su ląstelėmis, kurios buvo auginamos kultūroje tik 24 val. nuo išsėjimo pradžios. Tai proliferuojančios ląstelės. *14 paveiksle* pateikti proliferuojančių, kontaktinių ir diferencijuotų ląstelių pavyzdžiai.

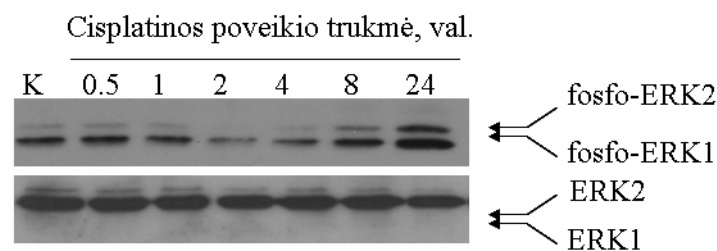
14 pav. Proliferuojančios (A), kontaktinės (B) ir diferencijuotos (C) Mio26 linijos ląstelės.

3.3.1. ERK signalinio kelio vaidmuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu diferencijuotose bei kontaktinėse ląstelėse

ERK signalinio kelio aktyvinimas yra svarbus ląstelių dalijimuisi, migracijai, ląstelės skeleto reorganizacijai, diferenciacijai ir ląstelių išgyvenimui, tačiau yra duomenų, kad ERK dalyvauja streso atsake bei ląstelės žūties procese [Werlen ir kt., 2003]. Siekdami išsiaiškinti ERK kinazės vaidmenį cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotoje apoptozėje, mes tyrėme ERK molekulių raišką ir fosforilinimą, kuris koreliuoja su šios kinazės aktyvinimu. Gauti duomenys pateikiami 15-17 paveiksluose.

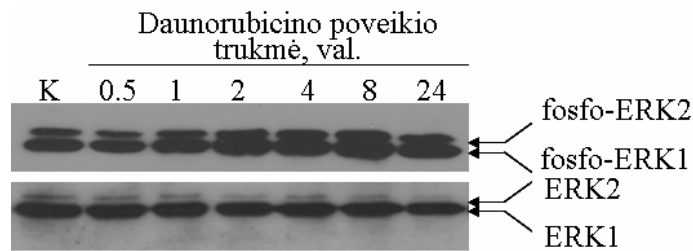


15 pav. ERK molekulių fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20 $\mu\text{g/ml}$) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). ERK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš ERK baltymą bei fosforilintas ERK formas (žr. Metodų skyrių).



16 pav. ERK molekulių fosforilinimas ir raiška kontaktinėse, proliferacijos terpėje auginantose Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20 $\mu\text{g/ml}$) poveikio. ERK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš ERK baltymą bei fosforilintas ERK formas (žr. Metodų skyrių).

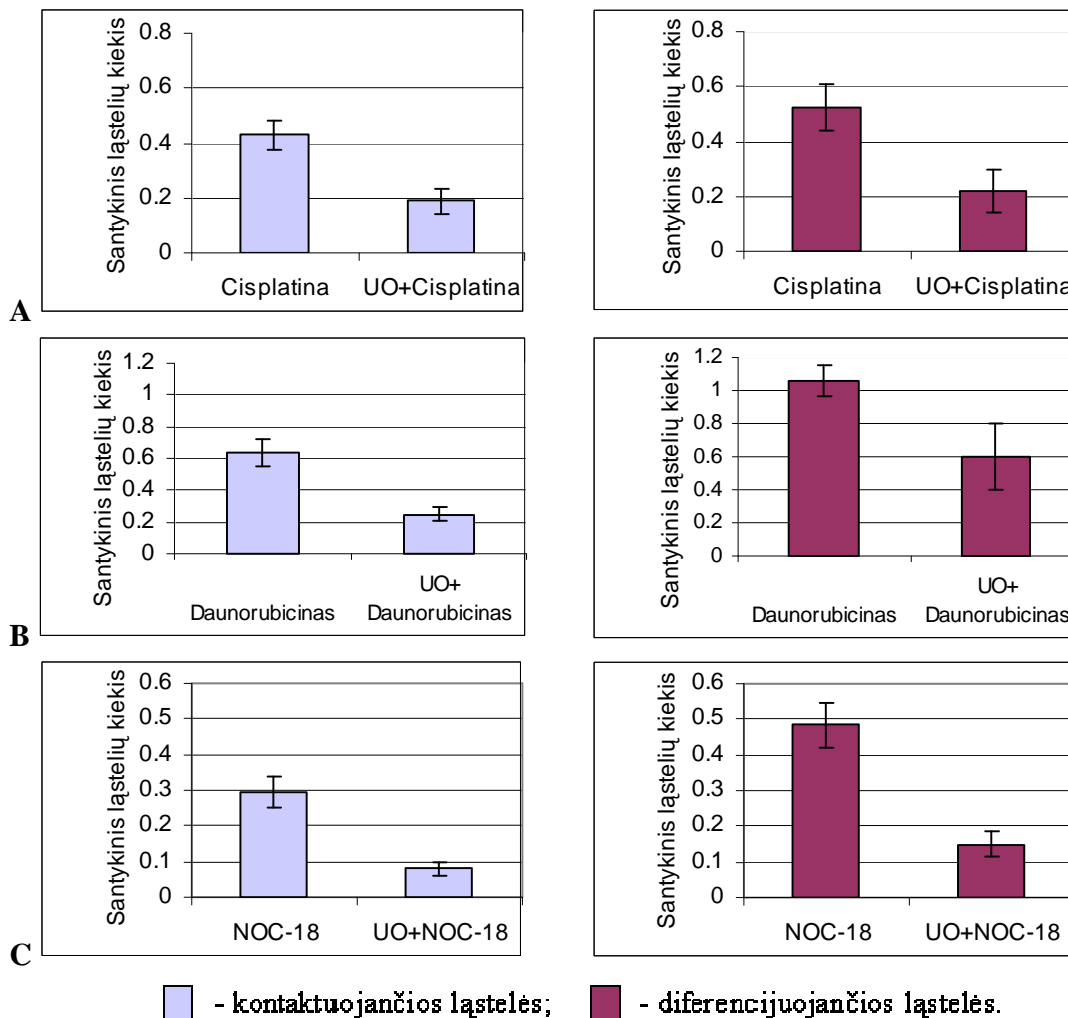
Palyginę ERK raišką diferencijuotose (15 pav.) ir kontaktinėse (16 pav.) Mio26 ląstelėse po cisplatinos poveikio, matome, kad ji išlieka pastovi visą tyrimo laikotarpį abiejose tirtose ląstelių populiacijose. Tačiau cisplatina sukelia vėlyvą, tik po 24 valandų nuo poveikio pradžios stebimą, ERK baltymų fosforilinimo lygio padidėjimą tiek diferencijuotose, tiek ir kontaktinės ląstelėse. Tolesnėje darbo dalyje tyrėme ERK kinazės vaidmenį daunorubicino sukeltose apoptozėje (17 pav.).



17 pav. ERK molekulių fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po daunorubicino (2.5µM) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). ERK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš ERK baltymą bei fosforilintas ERK formas (žr. Metodų skyrių).

Mūsų tyrimai rodo, kad diferencijuotose ir kontaktinėse (duomenys nepateikiami) Mio26 miogeninėse ląstelėse daunorubicinas nesukelia ERK1/2 kinazės raiškos ir fosforilinimo pokyčių. Jokių ryškesnių ERK raiškos ir fosforilinimo pokyčių nenustatyta ir po NOC-18 poveikio. Biochemijos institute atlikti ERK fosforilinimo tyrimai proliferuojančiose ląstelėse taip pat neparodė ryškesnių ERK fosforilinimo pokyčių nei po cisplatinos, nei po daunorubicino poveikio. Tačiau mūsų tiriamose ląstelėse ERK yra pastoviai fosforilinta, ir, palyginus su kitomis ląstelėmis, jos fosforilinimo lygis, ypač ERK 2, yra aukštas (duomenys nepateikti).

MAP kinazė ERK dažniausiai aktyvinama po mitogenų poveikio ir paprastai siejama su ląstelės proliferacija ir išgyvenimu, nors yra straipsnių ir apie jos proapoptozinį veikimą. Siekiant nustatyti, kokį vaidmenį ERK MAPK signalinis kelias atlieka indukuojant apoptozę miogeninėse ląstelėse jų diferenciacijos bei augimo kontaktinio stabdymo metu, ląsteles veikėme specifiniu ERK signalinio kelio inhibitoriumi – UO126 (18 pav.). Institute atlikti tyrimai parodė, kad 40 µM UO126 koncentracija efektyviai slopina ERK fosforilinimą stebimą 8 nuo poveikio pradžios valandą.



18 pav. ERK MAP kinazės vaidmuo kontaktinių ir diferencijuotų Mio26 ląstelių cisplatinos (A), daunorubicino (B) ir NOC-18 (C) indukuotoje apoptozėje. Ląstelės ERK inhibitoriumi UO126 paveiktos 30 min. anksčiau nei tiriamomis medžiagomis. Poveikio trukmė - 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

Mūsų gauti rezultatai rodo, kad ERK signalinio kelio inhibitorius UO126 (40 μ M) skatina cisplatinos (20 μ g/ml), daunorubicino (2,5 μ M) ir NOC-18 (5mM) indukuotą apoptozę. Todėl galima teigti, kad ERK signalinis kelias atlieka apsauginį vaidmenį miogeninėms ląstelėms atsakant į stresinius poveikius jų diferenciacijos metu. Tokie patys rezultatai buvo anksčiau gauti ir su proliferuojančiomis ląstelėmis, kurios veiktos tiriamomis medžiagomis praėjus 24 val. nuo jų išsėjimo.

Cisplatina paveiktoje Mio26 ląstelių populiacijoje nustatėme vėlyvą šios kinazės aktyvinimo padidėjimą. Daugelyje kitų ląstelių linijų yra stebimas nuolatinis ERK aktyvumas, ir dažnai sunku pasakyti, koks to aktyvumo vaidmuo. PC12 ląstelėse parodyta, kad stiprus, bet greitai praeinantis ERK aktyvinimas verčia ląsteles daugintis, o užsitęsęs aktyvinimas nukreipia ląsteles diferenciacijos kryptimi. Šis skirtumas yra pasiekiamas membraninių receptorių lygyje, kai Ras/Raf kelią aktyvuoja skirtingi receptoriai (pvz. EGFR ir NGFR), dalyvaujant cikliniam AMP [O'Neill ir Kolch, 2004]. Proliferacinis ERK vaidmuo yra siejamas su D1 ciklino padidinta raiška, kurią sukelia Ras/Raf signalinio kelio (kurio vienas žemiausių komponentų ir yra ERK) nuolatinis aktyvumas. Ciklinas D1 aktyvina Cdk4 ir Cdk6, kurios suka ląstelės ciklą. Tačiau nustatyta, kad ląstelės dauginasi tik tada, kai Ras/Raf kelias yra pastoviai, tačiau silpnai aktyvuotas: suintensyvėjus Ras/Raf signalinimui ląstelės nustoja proliferavę ir pradeda diferencijuotis. Šio reiškimo priežastimi yra įvardijamas p21-cip1, stiprus Cdk (nuo ciklino priklausoma kinazė) inhibitorius, kurio raiškai/aktyvumui reikalingas užsitęsęs ERK aktyvinimas [Kerkhoff ir Rapp, 1998].

Ką tik pasirodžiusiame straipsnyje yra skelbiama, kad transkripcijos faktoriaus c-Fos transkripcijos aktyvacijos domenai yra ERK kinazės aktyvacijos trukmės jutiklis. Kadangi c-Fos yra AP-1 šeimos dimerinių nurašymo veiksnių komponentas, c-Fos kiekio kitimas įtakoja dimerų sudėtį ir gali keisti ląstelinį atsaką. [Chalmers ir kt., 2007].

Apibendrinus šiuos faktus galima sakyti, kad ląstelės atsakas į apoptozės induktorių priklauso nuo bazinio ERK aktyvumo, jos aktyvinimo stiprumo ir aktyvinimo trukmės.

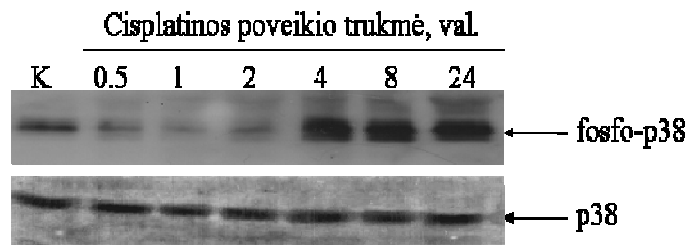
3.3.2. p38 MAPK signalinio kelio vaidmuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu diferencijuotose bei kontaktinėse ląstelėse

p38 MAP kinazių signalinis kelias svarbus eukariotinių ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir apoptozės metu. Dažniausiai ši streso aktyvinamų kinazių sistema yra siejama su apoptozės indukcija [Zarubin ir Han, 2005]. Tačiau yra duomenų, kad p38 gali būti ir neigiamas, ir teigiamas ląstelės išgyvenimo reguliatorius. Pavyzdžiui,

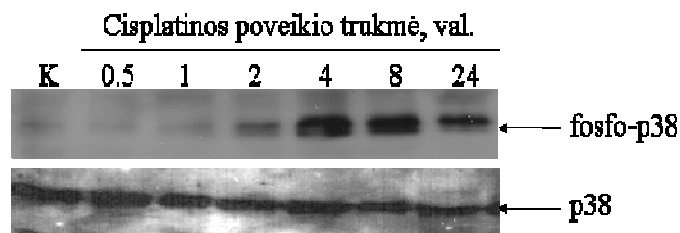
diferencijuotose PC12 ląstelėse p38 dalyvauja NGF (nervų augimo veiksnio) nebuvimo sukeltaje apoptozėje [Le-Niculescu ir kt., 1999]. Tačiau p38 apsaugo pirminius žiurkės kardiomiocitus nuo anizomicino indukuotos apoptozės [Zechner et al., 1998]. Kiti tyrimai nurodo skirtingas p38 α ir β formų funkcijas ląstelių išgyvenime: kardiomiocituose, Jurkat bei HeLa ląstelėse p38 α indukuoja apoptozę, o p38 β - sąlygoja išgyvenimą [Mackay ir Mochly-Rosen, 1999; Wang ir kt., 1998; Nemoto ir kt., 1998]. Taip pat yra nustatyta, kad p38 aktyvinamas transkripcijos veiksnys MEF2 yra reikalingas neuronų išgyvenimui [Mao ir kt., 1999].

p38 vaidmuo kardiomiocitų apoptozėje taip pat nėra vienareikšmis - priešingi literatūriniai duomenys nurodo p38 esant ir proapoptozinį [Zhu ir kt., 1999; Meldrum ir kt., 1998], ir už išgyvenimą atsakingą baltymą [Zechner ir kt., 1998; Craig ir kt., 2000; Hoover ir kt., 2000]. Taigi, p38 MAP kinazės dalyvavimas perduodant apoptozinį/išgyvenimo signalą priklauso nuo ląstelių tipo bei kitų sąlygų.

Šioje darbo dalyje tyrėme p38 baltymo raišką ir fosforilinimą, kuris paprastai koreliuoja su šios kinazės aktyvimu, diferencijuotose ir kontaktinėse Mio26 ląstelėse (19 ir 20 pav.).



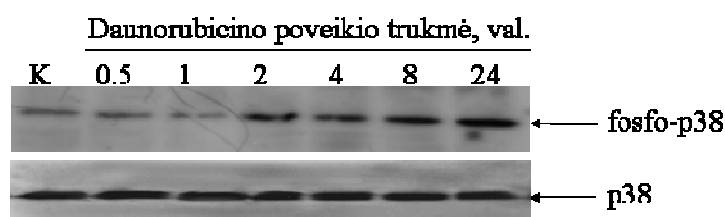
19 pav. p38 MAPK fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20 μ g/ml) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). p38 MAPK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnus prieš p38 baltymą bei fosforilintą p38 formas (žr. Metodų skyrių).



20 pav. p38 MAPK fosforilinimas ir raiška kontaktinėse Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20µg/ml) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos proliferacijos terpėje (IMDM + 10 % FBS). p38 MAPK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš p38 baltymą bei fosforilintas p38 formas (žr. Metodų skyrių).

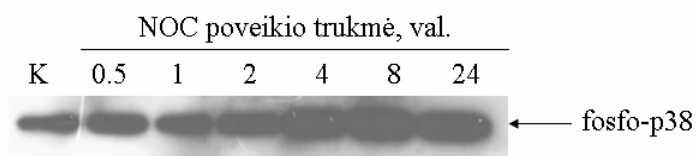
Iš rezultatų matome, kad kontaktinėse ir diferencijuotose ląstelėse p38 MAPK raiška po cisplatinos poveikio nesikeičia, bet fosforilinimas pradeda kilti po poveikio ir pasiekia maksimumą ketvirtą poveikio valandą. Kontaktuojančiose ir diferencijuotose ląstelėse aukštas fosfo-p38 lygis išlieka iki dvidešimt ketvirtos valandos.

p38 raiškos ir fosforilinimo tyrimai po daunorubicino poveikio ląstelėse parodė, kad diferencijuotose ir kontaktinėse (duomenys nepateikiami) miogeninėse ląstelėse šios kinazės raiška nesikeitė, tačiau, kaip ir cisplatinos atveju, buvo indukuojamas palaipsniui fosforilinimo lygio didėjimas, kuris maksimumą pasiekė 24 poveikio valandą (*21 pav.*).



21 pav. p38 MAPK fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po daunorubicino (2,5 µM) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). p38 MAPK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš p38 baltymą bei fosforilintas p38 formas (žr. Metodų skyrių).

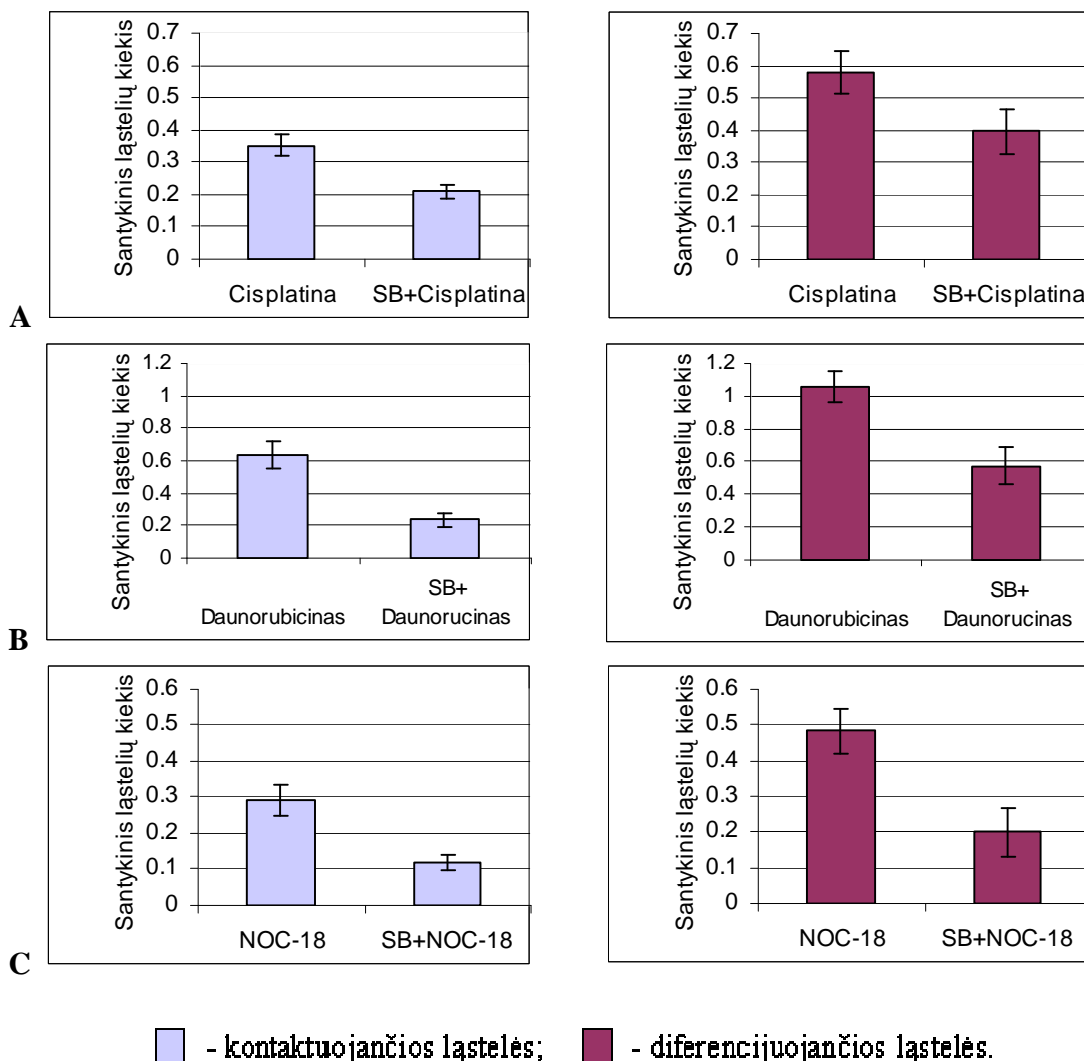
Tokią pat p38 MAPK raiškos ir fosforilinimo tendenciją nustatėme ir tirdami p38 aktyvinimą diferencijuotose ląstelėse po azoto oksido NOC-18 poveikio. *22 paveiksle* matome, kad, NOC-18 paveiktose diferencijuotose Mio26 ląstelėse, JNK fosforilinimas yra indukuojamas palaipsniui ir poveikio laikui ilgėjant, fosfo-p38 kiekis didėja (*22 pav.*).



22 pav. p38 MAPK fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po NOC-18 (5 mM) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM +

2 % arklio serumo). p38 MAPK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš p38 baltymą bei fosforilintas p38 formas (žr. Metodų skyrių).

Siekdami nustatyti p38 MAP kinazės signalinio kelio vaidmenį cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 sukeltose miogeninių ląstelių apoptozėje, kontaktuojančias ir diferencijuotas ląsteles veikėme p38 kinazės specifiniu inhibitoriumi SB203580 (SB). Kaip ir daugelis kitų kinazių inhibitorių, SB203580 blokuoja ATP prisirišimą. Gauti duomenys pateikiami 23 paveiksle.



23 pav. p38 MAP kinazės vaidmuo kontaktinių ir diferencijuotų Mio26 ląstelių cisplatinos (A), daunorubicino (B) ir NOC-18 (C) indukuotoje apoptozėje. Ląstelės p38 MAPK inhibitoriumi SB203580 paveiktos 30 min. anksčiau nei tiriamomis medžiagomis. Poveikio trukmė - 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio, santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų

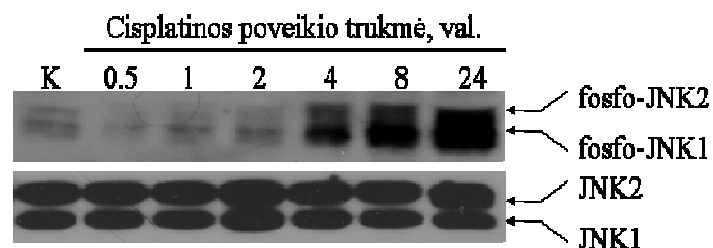
pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

Taigi, mūsų gauti rezultatai rodo, kad p38 MAPK slopinimas didina ląstelių žuvimą po cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 poveikio. Tai leidžia manyti, kad miogeninių ląstelių diferenciacijos ir kontaktinio augimo metu streso kinazė p38 apsaugo ląsteles nuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės. Ir, nors literatūros duomenimis ilgalaikis streso kinazių aktyvinimo padidėjimas paprastai siejamas su jų dalyvavimu apoptozės indukcijoje, mūsų gauti duomenys apie p38 kinazės palaipsnį ir ilgalaikį fosforilinimo/aktyvinimo didėjimą kamieninėse miogeninėse ląstelėse ir jos slopinimo metu padidėjusią ląstelių žūtį, neparemia šios hipotezės.

3.3.3. JNK signalinio kelio vaidmuo cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu diferencijuotose, kontaktinėse ir proliferuojančiose ląstelėse

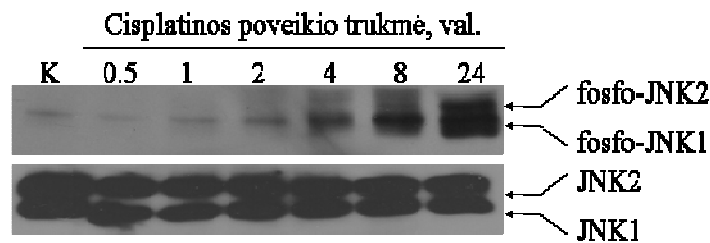
c-Jun N-galinė kinazė (JNK) priklauso streso aktyvinamų baltymų kinazių grupei ir paprastai siejama su apoptozės indukcija. Žinoma, kad įvairūs veiksniai - hiperosmotinis šokas, hipoksija/reoksigenacija, baltymų sintezės inhibitoriai (pvz. anizomicinas), reaktyvūs deguonies junginiai (ROS), uždegiminiai citokinai ir kt. - aktyvina šią kinazę širdies miocitų kultūroje, tačiau žinios apie šio kelio vaidmenį kardiomiocitų kultūroje yra gana prieštaringos: įvairių tyrimų duomenimis širdies miocituose JNK MAP kinazė atlieka tiek pro-, tiek ir antiapoptozinį vaidmenį [Aoki ir kt., 2002].

Šioje darbo dalyje tyrėme JNK kinazės raišką ir fosforilinimą diferencijuojančiose ir kontaktuojančiose Mio26 ląstelėse po genotoksinių medžiagų ir NOC-18 poveikio. Diferencijuotose Mio26 ląstelėse cisplatina indukavo palaipsnį ir ilgalaikį JNK1/2 fosforilinimą, kuris koreliuoja su baltymo aktyvinimu. Tuo tarpu JNK raiška cisplatinos poveikio pasėkoje nekito (24 pav.).



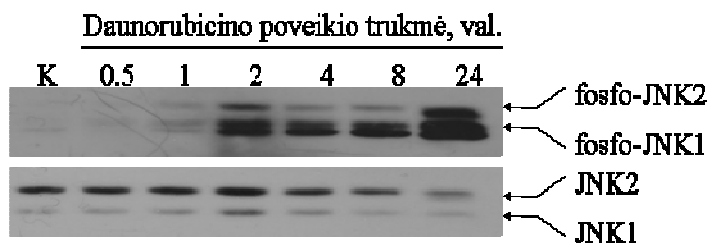
24 pav. JNK fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20µg/ml) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). JNK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš JNK baltymą bei fosforilintas JNK formas (žr. Metodų skyrių).

Ištyrę JNK aktyvinimą kontaktuojančiose Mio 26 ląstelėse, paveiktose cisplatiną, gavome panašius duomenis - po cisplatinos poveikio taip pat buvo indukuojamas palaipsnis ir ilgalaikis JNK1/2 aktyvinimas. Kaip ir diferencijuotose, taip ir kontaktinėse ląstelėse JNK raiška nekito, o išliko pastovi visą tyrimo laikotarpį (25 pav.).



25 pav. JNK fosforilinimas ir raiška kontaktinėse, proliferacijos terpėje auginantose Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20µg/ml) poveikio. JNK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnus prieš JNK baltymą bei fosforilintas JNK formas (žr. Metodų skyrių).

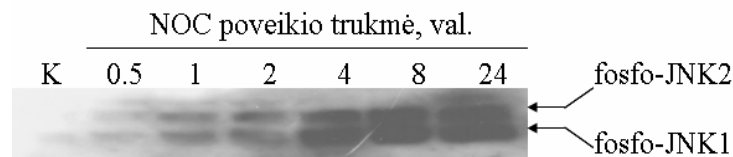
Tolesnėje darbo dalyje analizavome JNK1/2 raišką ir aktyvinimą diferencijuojančiose ir kontaktuojančiose ląstelėse po daunorubicino poveikio. Mūsų tyrimai parodė, kad diferencijuojančiose ir kontaktuojančiose (duomenys nepateikiami) ląstelėse daunorubicinas indukuoja palaipsni ir ilgalaikį JNK kinazės aktyvinimą. Tuo tarpu JNK raiška po daunorubicino poveikio nesikeičia (26 pav.).



26 pav. JNK molekulių fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po daunorubicino (2 µM) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje

(DMEM + 2 % arklio serumo). JNK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš JNK baltymą bei fosforilintas ERK formas (žr. Metodų skyrių).

Paveikę mūsų tiriamas diferencijuotas miogenines Mio26 ląsteles azoto oksido donoru NOC-18, nustatėme tokią pat JNK fosforilinimo eigą kaip ir cisplatinos bei daunorubicino atveju - 27 *paveiksle* matome palaipsnių ir ilgalaikį JNK1/2 fosforilinimą.



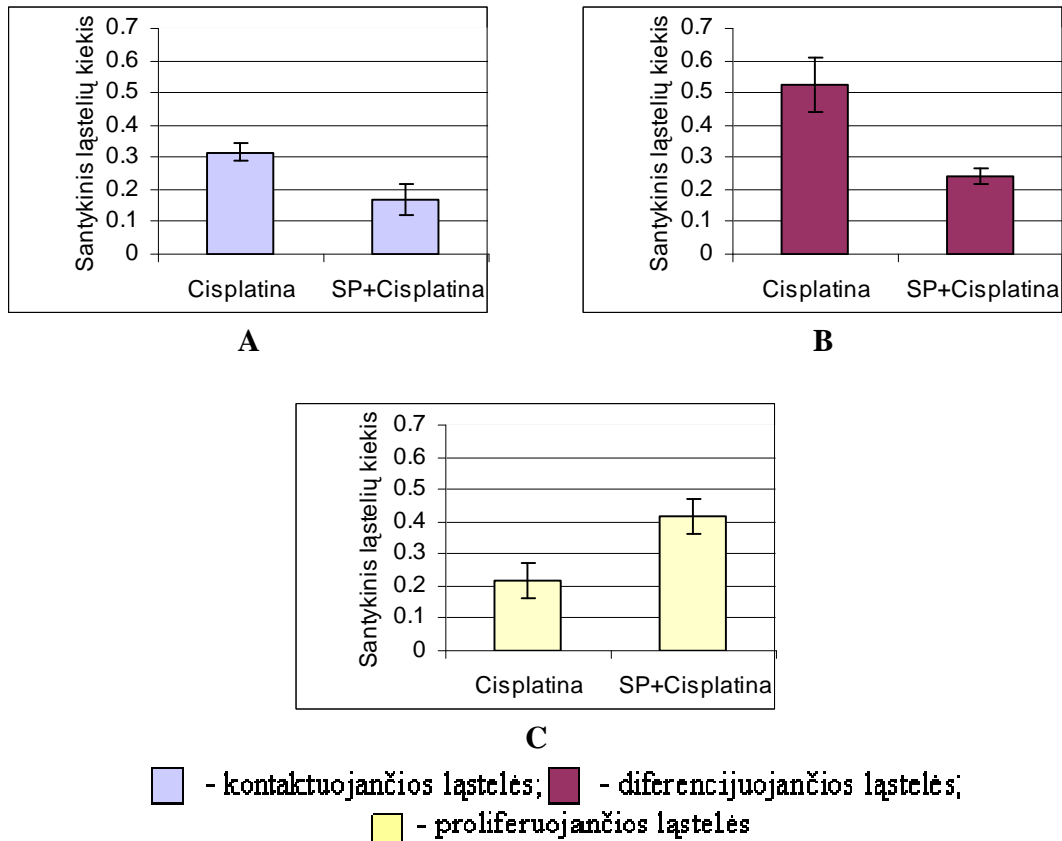
27 pav. JNK molekulių fosforilinimas ir raiška diferencijuotose Mio26 ląstelėse po NOC-18 (5 mM) poveikio. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). JNK molekulių raiška ir fosforilinimas buvo nustatyti panaudojus specifinius antikūnius prieš JNK baltymą bei fosforilintas ERK formas (žr. Metodų skyrių).

Streso kinazių aktyvinimas dažniausiai yra stebimas ląstelei atsakant į viduląstelinius ir ekstraląstelinius stresinius poveikius. JNK signalinio kelio vaidmuo dar nėra galutinai išaiškintas: jis gali ir skatinti apoptozę, ir ją stabdyti, priklausomai nuo ląstelių tipo bei induktoriaus [Tourner ir kt., 2000; Aoki ir kt., 2002]. Tačiau yra iškelta hipotezė, kad ilgalaikis JNK aktyvinimas veda ląstelės žūties link, tuo tarpu kai trumpalaikis aktyvinimas sąlygoja ląstelės išgyvenimą [Lou ir kt., 2005].

Norėdami išaiškinti, kokį vaidmenį JNK aktyvinimas vaidina miogeninėse ląstelėse genotoksiniu medžiagu ir NOC-18 indukuotos apoptozės metu, naudojome specifinį šios kinazės inhibitorių SP600125 (SP). SP600125 rišasi prie JNK ATP prisirišimo vietos ir taip blokuoja JNK funkciją.

Tirdami JNK vaidmenį cisplatinos indukuotoje ląstelių apoptozėje gavome gana netikėtus rezultatus. Kiek anksčiau mūsų laboratorijoje buvo nustatytas proapoptozinis JNK kelio vaidmuo cisplatinos paveiktose proliferuojančiose ląstelėse. Tuo tarpu šiame darbe parodėme, kad diferencijuotose ir kontaktinėse miogeninėse ląstelėse JNK po cisplatinos poveikio pasižymi nuo apoptozės apsaugančių veikimu. Tokie rezultatai buvo gauti eksperimentuose lygiagrečiai JNK inhibitoriumi SP600125 bei cisplatiną paveikus diferencijuotas (keturios paros diferencijuojančioje terpėje) bei kontaktines (keturios paros proliferacijos terpėje) Mio 26 ląsteles. 28 *paveiksle* matome, kad JNK inhibitorius,

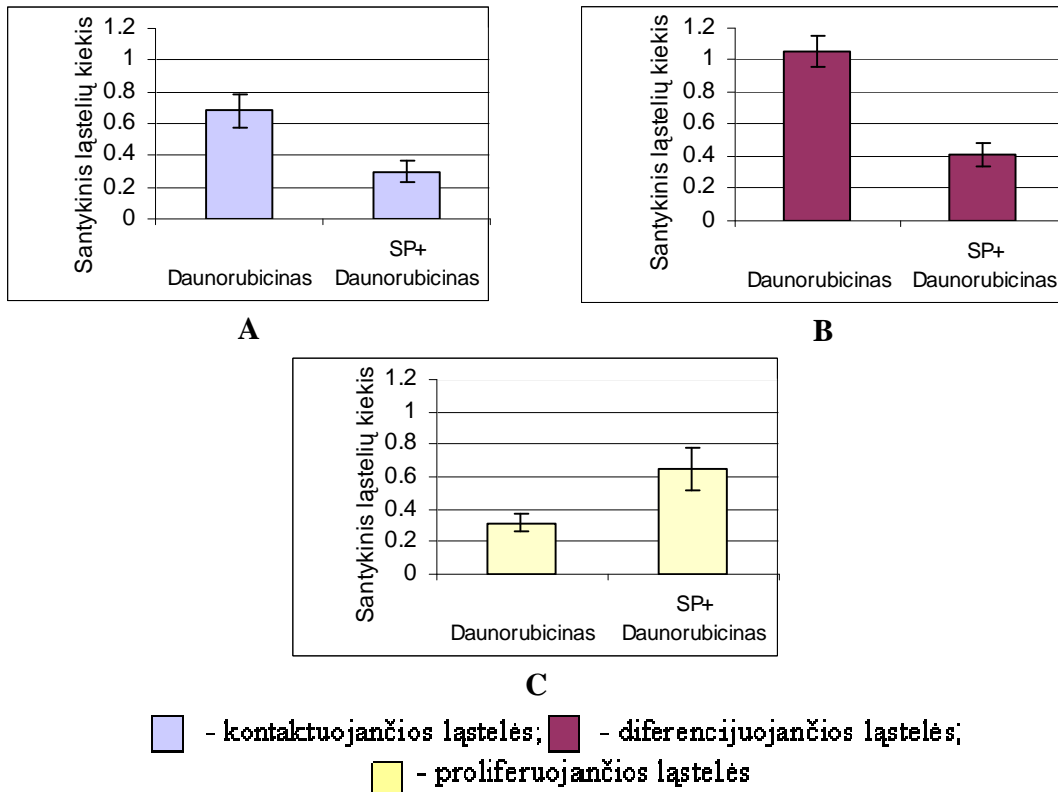
stabdė proliferuojančių ląstelių žuvimą ir didino diferencijuotų ir kontaktuojančių ląstelių žuvimą po cisplatinos poveikio.



28 pav. JNK MAP kinazės vaidmuo kontaktinių (A), diferencijuotų (B) ir proliferuojančių (C) Mio26 ląstelių apoptozėje, indukuotoje cisplatinos. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). Lygiagrečiai tokį pat laiką kultūroje buvo auginamos kontaktuojančios ląstelės. Proliferuojančios ląstelės buvo veikiamos kitą dieną po išsėjimo. Ląstelės JNK inhibitoriumi SP600125 buvo veikiamos 30 min. anksčiau nei cisplatinos. Poveikio trukmė - 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

JNK vaidmens pasikeitimą iš proapoptozinio, proliferuojančių ląstelių atveju, į antiapoptozinį, miogeninių ląstelių diferenciacijos bei kontaktinio augimo metu,

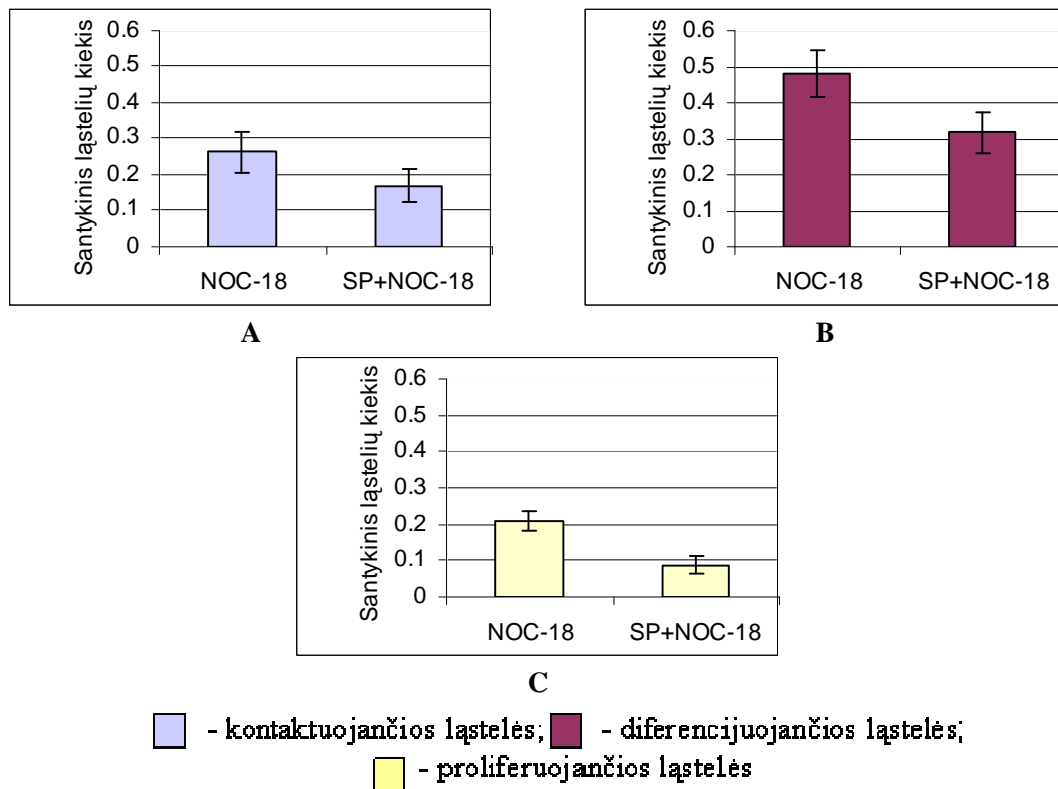
nustatėme ir kitos genotoksinės/kardiotoksinės medžiagos - daunorubicino indukuotoje ląstelių apoptozėje (29 pav.).



29 pav. JNK MAP kinazės vaidmuo kontaktinių (A), diferencijuotų (B) ir proliferuojančių (C) Mio26 ląstelių apoptozėje, indukuotoje daunorubicino. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). Lygiagrečiai tokį pat laiką kultūroje buvo auginamos kontaktuojančios ląstelės. Proliferuojančios ląstelės buvo veikiamos kitą dieną po išsėjimo. Ląstelės JNK inhibitoriumi SP600125 buvo veikiamos 30 min. anksčiau nei daunorubicinu. Poveikio trukmė - 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio, santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

Atlikus analogiškus tyrimus su oksidacinį stresą širdyje imituojančia medžiaga – fiziologinio apoptozės induktoriaus - azoto oksido donoru NOC-18, JNK vaidmens pasikeitimų nebuvo nustatyta. Visais atvejais, tiek proliferuojančiose, tiek ir diferencijuotose bei kontaktinėse Mio26 ląstelėse, JNK inhibitorius SP visais atvejais

skatino ląstelių žūtį (30 pav.). Taigi, JNK MAP kinazės signalinis kelias apsaugo kamienines miogenines ląsteles nuo NOC-18 indukuotos apoptozės.



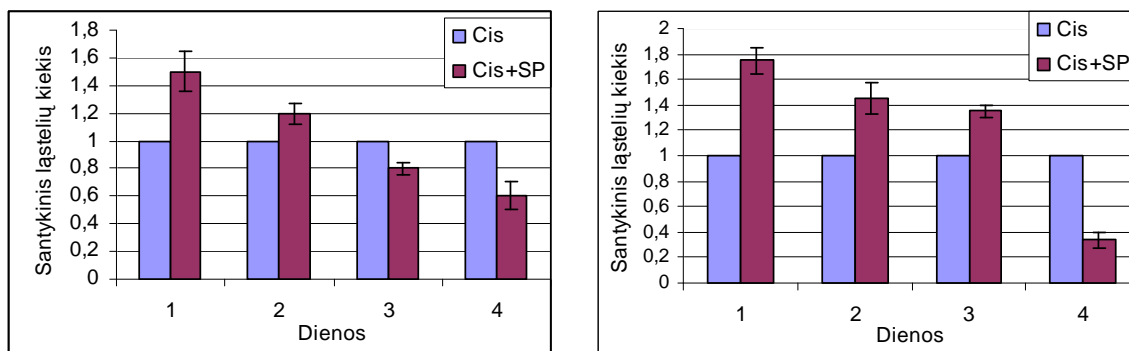
30 pav. JNK MAP kinazės vaidmuo kontaktinių (A), diferencijuotų (B) ir proliferuojančių (C) Mio26 ląstelių apoptozėje, indukuotoje NOC-18. Prieš poveikį ląstelės buvo keturias paras auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). Lygiagrečiai tokį pat laiką kultūroje buvo auginamos kontaktuojančios ląstelės. Proliferuojančios ląstelės buvo veikiamos kitą dieną po išsėjimo. Ląstelės JNK inhibitoriumi SP600125 buvo veikiamos 30 min. anksčiau nei NOC-18. Poveikio trukmė - 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio, santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis \pm standartinis nuokrypis.

Literatūroje yra gana prieštaringų duomenų apie JNK vaidmenį ląstelėse oksidacinio streso metu. Vienu autorių duomenimis, JNK atlieka proapoptozinį vaidmenį ląstelėms atsakant į oksidacinį stresą. Nustatyta, kad oksidacinio streso veikiamuose širdies miocituose ilgalaikis JNK aktyvinimas skatina proapoptozinių molekulių - citochromo c ir AIF – išlaisvinimą iš mitochondrijų [Aoki ir kt., 2002]. Tuo tarpu kitose literatūros šaltiniuose nurodomas antiapoptozinis šios kinazės vaidmuo oksidacinio streso metu [Dougherty ir kt., 2002; Andreka ir kt., 2001].

Yra duomenų, kad proapoptozinis JNK veikimas pasireiškia jai fosforilinant antiapoptozinio baltymo - Bcl-X_L Thr-47 ir Thr-115. Tai sąlygoja Bcl-X_L inaktyvaciją, citochromo c išlaisvinimą bei kaspazių 9 ir 3 aktyvinimą. Tuo tarpu, fosforilindamas Bcl-2 baltymo Ser-70, JNK apsaugo ląsteles nuo žūties apoptozės būdu. Taigi, specifinis liekanų fosforilinimas gali skatinti arba slopinti antiapoptozines Bcl-2 baltymų šeimos funkcijas. Fosforilinimas keičia Bcl-2 baltymo stabilumą bei sąveikas su kitais šios šeimos nariais. JNK gali apsaugoti ląsteles nuo apoptozės ir nepriklausomai nuo Bcl-2 baltymų keliu. Antiapoptozinis JNK veikimas gali būti nulemtas sąveikos su kitais antiapoptoziniais keliais, tokiais kaip PI3K/Akt signalinis kelias. Dar vienas kelias, nustatytas širdies miocituose, tai AP-1 transkripcijos aktyvatoriaus, kurio sudėtyje yra Fos-Jun transkripcijos veiksniai, aktyvinimo kelias. JNK indukuotas AP1 aktyvinimas, priklausomai nuo ląstelių rūšies ar apoptozės induktoriaus, gali nulemti ląstelių žūtį ar išgyvenimą [Dougherty ir kt., 2002]. Antiapoptozinis JNK signalas gali būti perduodamas per JunD transkripcijos veiksnį [Lamb ir kt. 2003].

JNK aktyvinimo kinetika apsprendžia biologinį ląstelės atsaką į JNK aktyvinimą: trupalaikis, iki 1 val., JNK aktyvinimas paprastai yra susijęs su ląstelės išgyvenimo signalo perdavimu, o vėlesnis ir ilgiau išliekantis (1-6 val.) - perduoda apoptozinį signalą [Ventura ir k t., 2006]. Tačiau mūsų gauti rezultatai su iš triušio raumens gautomis kamieninėmis ląstelėmis nepatvirtina šitų duomenų. Apibendrinus mūsų tirimų duomenis, galima daryti išvadą, kad stresų aktyvinamos proteinkinazės JNK vaidmuo apoptozės indukcijoje skiriasi priklausomai nuo apoptozės induktoriaus, ląstelių kontaktų ir ląstelių diferenciacijos būsenos.

Tolesnėje darbo dalyje tyrėme, kokį vaidmenį ląstelių kontaktai atlieka keičiantis proapoptoziniam JNK veikimui į antiapoptozinį po cisplatinos poveikio. Tuo tikslu, ląstelės buvo išsėjamos tokiu tankiu, kuriam esant kontaktinėje kultūroje buvo stebimas antiapoptozinis JNK veikimas. Eksperimentai buvo atliekami keturias dienas, ląstelės cisplatina ir SP600125 veiktos 1, 2, 3 bei ketvirtą parą po jų išsėjimo (31 pav.). Ląstelės visą tyrimo laiką buvo auginamos proliferacijos terpėje.



A

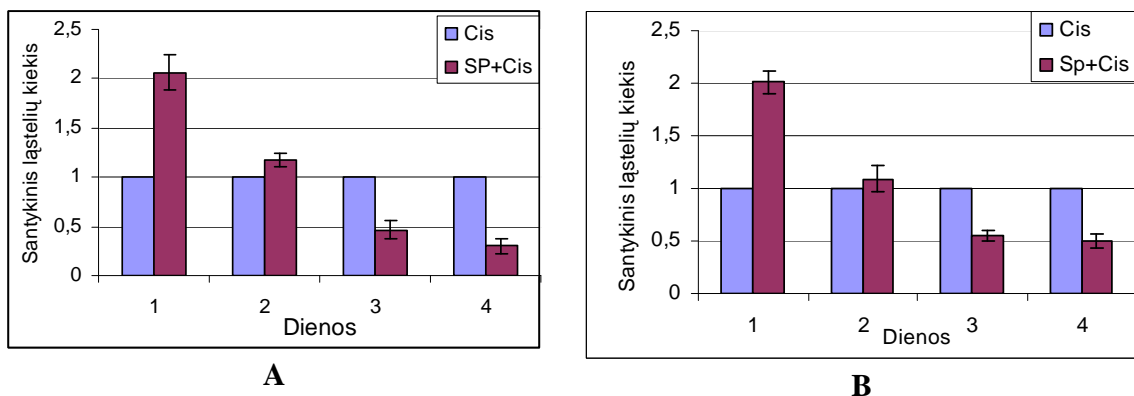
B

31 pav. JNK MAP kinazės vaidmens pasikeitimo iš proapoptozinio į antiapoptozinį tyrimas po cisplatinos poveikio tankioje (A) ir retoje (B) Mio 26 ląstelių kultūroje. Ląstelės buvo auginamos proliferacijos terpėje (IMDM + 10 % FBS). Ląstelės JNK inhibitoriumi SP600125 buvo veikiamos 30 min. anksčiau nei cisplatina. Poveikio trukmė – 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio, santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis ± standartinis nuokrypis.

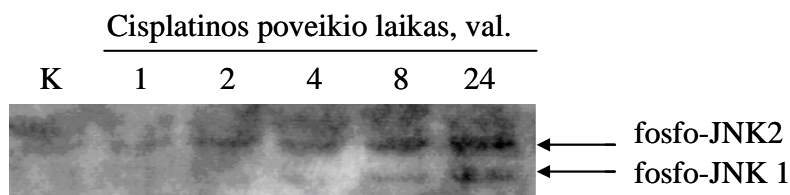
Kaip matyti 31 A paveiksle, 1 dieną po išsėjimo cisplatina paveiktose, tankiai augančiose ląstelėse (angl. *confluent culture*) JNK inhibitorius SP600125 stabdė ląstelių žuvimą, t.y. pasireiškė proapoptozinis JNK veikimas. 2 augimo dieną cisplatina paveiktoje ląstelių kultūroje SP600125 pasižymėjo mažesne įtaka ląstelių gyvybingumui, o paveiktą Mio26 ląstelių cisplatina ir SP600125 trečią augimo dieną jau nustatėme antiapoptozinį JNK veikimą. Dar ryškesnius skirtumus gavome ketvirtą augimo dieną paveiktoje ląstelių populiacijoje. Taigi, gauti rezultatai leidžia teigti, kad JNK vaidmens pasikeitimas iš pro- į antiapoptozinį yra nulemtas ne ląstelių tankio, o ląstelių kontaktavimo trukmės. Šią prielaidą patvirtinome atlikę tyrimus su retai išsėtomis Mio26 ląstelėmis, tarp kurių bandymo pradžioje jokių kontaktų nebuvo (32 B pav.). Kaip matyti 32 A paveiksle, proapoptozinio JNK veikimo pasikeitimas į antiapoptozinį retai išsėtoje Mio26 ląstelių kultūroje įvyko tik ketvirtą augimo dieną cisplatina paveiktose ląstelėse, kai tarp jų susidarė kontaktai. Tankesnėje kultūroje JNK vaidmens pasikeitimas vyko greičiau. Taigi, ląstelių kontaktai yra svarbūs keičiantis JNK vaidmeniui iš proapoptozinio į antiapoptozinį.

Žinoma, kad ląstelių kontaktai yra būtini diferenciacijai. Kontaktuojančios ląstelės gali būti toliau pažengę diferencijuotų ląstelių linkme net ir proliferacijos terpėje. Kitoje tyrimų dalyje lyginome tankiai ir retai išsėtą ląstelių žūtį po JNK inhibitoriaus SP600125 ir cisplatinos poveikio diferencijuojančioje terpėje (33 ir 34 pav.). Lyginant su

duomenimis, pateiktais 31 ir 32 paveiksluose, matome, kad tiek retoje, tiek tankioje ląstelių kultūroje, augintoje diferenciacijos terpėje, JNK vaidmens pasikeitimas iš proapoptozinio į antiapoptozinį įvyksta anksčiau nei proliferacijos terpėje augintose ląstelėse. Taigi, ši JNK vaidmens pasikeitimą sąlygoja tiek kontaktai tarp ląstelių, tiek ir ląstelių diferenciacijos stadija. Tačiau jis nėra apspręstas JNK aktyvinimo trukmės skirtumų. 35 paveiksle pateikiame duomenis apie JNK aktyvinimą po cisplatinos poveikio proliferuojančiose ląstelėse. JNK aktyvinimas šiose ląstelėse yra palapsnis ir ilgalaikis, kaip ir kontaktuojančių bei diferencijuotų ląstelių kultūroje. Tiesa, proliferuojančiose ląstelėse stebimas didesnis JNK2 aktyvinimas negu diferencijuotose ląstelėse, kuriose JNK1 aktyvinimas vyksta anksčiau ir yra labiau išreikštas. Literatūroje yra nuorodų apie skirtingą JNK1 ir JNK2 dalyvavimą ląstelės funkcijų reguliavime. Mūsų gauti duomenys nepatvirtina literatūroje iškelto prielaidos apie tai, kad apoptozės slopinimas yra sąlygojamas ankstyvo bei trumpalaikio JNK kinazės aktyvinimo, o ilgalaikis JNK aktyvinimas yra susijęs su apoptozės stimuliacija.



33 pav. JNK MAP kinazės vaidmens tyrimas po cisplatinos poveikio tankioje (A) ir retoje (B) Mio 26 ląstelių kultūroje. Ląstelės buvo auginamos diferenciacijos terpėje (DMEM + 2 % arklio serumo). Ląstelės JNK inhibitoriumi SP600125 buvo veikiamos 30 min. anksčiau nei cisplatina. Poveikio trukmė – 24 val. Santykinis ląstelių kiekis - ląstelių skaičiaus po poveikio, santykis su ląstelių skaičiumi medžiagų pridėjimo dieną. Skaičiuotos tik gyvos ląstelės; gyvybingumas vertintas tripano mėlio testu. Grafikuose vaizduojamas mažiausiai trijų eksperimentų vidurkis ± standartinis nuokrypis.



35 pav. JNK fosforilinimas proliferuojančiose Mio26 ląstelėse po cisplatinos (20µg/ml) poveikio. Ląstelės augintos proliferacijos terpėje (IMDM + 10 % FBS). JNK molekulių fosforilinimas buvo nustatytas panaudojus specifinius antikūnus prieš fosforilintas JNK formas (žr. Metodų skyrių).

Apoptozės reguliacijos mechanizmų tyrimai parodė, kad MAP kinazės - ERK, p38 ir JNK - apsaugo ląsteles nuo apoptozės induktorių - cisplatinos, daunorubicino ir NOC-18 - poveikio kamieninių linijų ląstelių miogeninės diferenciacijos metu. Nustatyta, kad kamieninių ląstelių diferenciacijos proceso metu JNK vaidmuo gali keistis iš proapoptozinio į antiapoptozinį, nors JNK aktyvinimo kinetika po apoptozės induktorių poveikio proliferuojančiose ir diferencijuotose ląstelėse nesiskiria. JNK vaidmens pasikeitimo greitis priklauso nuo ląstelių kontaktų trukmės.

Taigi, norint padidinti transplantuojamų kamieninių ląstelių išgyvenimą patologiniame židinyje panaudojant MAP kinazių signalinių kelių aktyvinimo ar slopinimo strategijas reikia atsižvelgti į ląstelių diferenciacijos stadiją jų prigijimo organizme proceso metu.

IŠVADOS

- Iš raumens išskirtos kamieninės ląstelės, pasižyminčios neribotu proliferaciniu potencialu *in vitro*, gali diferencijuotis miogeninių ląstelių kryptimi. Diferenciacijos metu jose aktyvinama miozino sunkiųjų grandinių (MHC), transkripcijos veiksnio miogenino raiška; susiformuoja daugiabranduolės ląstelės.
- Miogeninės diferenciacijos metu mažėja plyšinės jungtis tarp ląstelių sudarančio baltymo koneksino Cx43 raiška.
- Diferenciacijos metu miogeninės ląstelės tampa atsparesnės apoptozės induktoriams.
- Diferencijuotose ir kontaktinėse ląstelėse genotoksinės medžiagos – cisplatina ir daunorubicinas, bei oksidacinį stresą širdyje imituojanti medžiaga - azoto oksido donoras NOC-18, indukuoja palaispni ir ilgalaikį streso aktyvinamų MAP kinazių - p38 ir JNK - fosforilinimo padidėjimą.
- MAP kinazės - ERK, p38 ir JNK - dalyvauja apsaugant diferencijuotas kamienines miogenines ląsteles nuo apoptozės.
- Proliferuojančioms kamieninėms ląstelėms diferencijuojantis miogeninių ląstelių kryptimi, streso aktyvinimos kinazės JNK vaidmuo apoptozėje reguliacijoje gali keistis iš proapoptozinio į antiapoptozinį.

Darbą atliko:
Darbo vadovė:

SANTRAUKA

Kamieninių ląstelių apoptozę ar išgyvenimą sąlygojantys signaliniai keliai yra potencialus taikyns tobulinant kardiomioplastijos metodą. Šiame darbe, pagal specifinius baltymus - žymenis ir morfologinius požymius patvirtinome iš triušio raumens gautų ląstelių, pasižyminčių neribotu proliferaciniu potencialu *in vitro*, gebėjimą diferencijuotis miogenine linkme. Tyrėme ląstelių žūtį/išgyvenimą sąlygojančius mechanizmus, ląstelėms atsakant į genotoksinių medžiagų, bei fiziologinio apoptozės induktoriaus – azoto oksido donoro – NOC-18 poveikį. Nustatėme didesnę diferencijuotų ląstelių, palyginus jas su proliferuojančiomis, atsparumą minėtoms medžiagoms. Tyrimai parodė apsauginį ERK, JNK ir p38 MAP kinazių vaidmenį ląstelių diferencijuotų miogenine kryptimi apoptozėje. Buvo nustatytas JNK vaidmens pasikeitimas iš pro- į antiapoptotinį, priklausomai nuo ląstelių diferenciacijos stadijos ir ląstelių kontaktavimo trukmės.

SUMMARY

Studies of muscle-derived stem cell death and survival mechanisms during their proliferation and differentiation

Stem cell apoptosis/survival signaling pathways are potential gains in the development of cardiomyoplasty method. During this work, by specific myogenic protein and morphology there was demonstrated the myogenic origin of cells derived from rabbit muscle and their ability to differentiate into muscle cells. There were studied molecular mechanisms governing the death/survival pathways of primary myogenic cells in response to treatment with genotoxic drug cisplatin, daunorubicin and nitric oxide donor NOC-18. Differentiated cells appeared to be more resistant to the above substances as compared to proliferating cells. The study has proved the protective role of ERK, JNK or p38 MAP kinases in differentiated muscle stem cell apoptosis. There was observed a change of JNK function from pro- to antiapoptotic depending on cell differentiation stages and cell contact duration.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 Is a Specific Inhibitor of the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 46: 27489-27494.
2. Al-Rubeai, M., Singh, R.P. (1998) Apoptosis in cell culture. *Curent Opinion in Biotechnology* 9: 152-156.
3. Ambrosino, C., Nebreda, A.R. (2001) Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biology of the cell* 93: 47-51.
4. Anderson J. E. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. *Mol Biol Cell* 2000; 11(5):1859-74.
5. Andreaka P, Zang J, Dougherty C, Slepak TI, Webster KA, Bishopric NH. Cytoprotection by Jun kinase nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ. Res.* 2001;88:305-312.
6. Aoki H, Yoshimura K, Kang PM, Hampe J, Noma T, Matsuzaki M, Izumo S. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *JBC Papers in Press*, 2002.
7. Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res.* 1999 Oct 29;85(9):829-40.
8. Asakura A, Komaki M, Rudnicki MA (2001). Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68 (4-5), pp. 245-253.
9. Asakura A, Rudnicki MA (2002). Side population cells diverse adult tissues are capable of *in vitro* hematopoietic differentiation. *Experimental hematology*, 30(11), pp. 1339-1345.
10. Baines CP, Molckentin JD. Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005; 38:47-62.
11. Beauchamp P, Richard V, Tamion F, Lallemand F, Lebreton JP, Vaudry H, Daveau M, Thuillez C. Protective effects of preconditioning in cultured rat endothelial cells: effects on neutrophil adhesion and expression of ICAM-1 after anoxia and reoxygenation. *Circulation* 1999; 100(5):541-6.
12. Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M., Anderson, D.W. (2001) *PNAS* 24: 13681-13686.
13. Bergstrom D. A., Tapscott S. J. (2001) Molecular distinction between specification and differentiation in the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. *Molecular and cellular biology*, p. 2404-2412.
14. Berndt, N. (1999) Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Frontiers in Bioscience* 4, d22-42.
15. Bjelakovic G., Nagorni A., Bjelakovic M., Stamenkovic I., Arsic R., Katic V. *Medicine and biology* 12:6-11, 2005.
16. Bukelskienė V, Baltriukienė D, Bironaitė D, Imbrasaitė A, Širmenis R, Balčiūnas M, Žurauskas E, Kalvelytė A. Muscle-derived primary stem cell lines for heart repair. *Seminars in Cardiology*. 2005; 11(3):1-7.

17. Chalmers CJ, Gilley R, March HN, Balmanno K, Cook SJ (2007). The duration of ERK1/2 activity determines the activation of c-Fos and Fra-1 and the composition and quantitative transcriptional output of AP-1. *Cell Signal* 19(4):695-704.
18. Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS, Brugge JS (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Current Biology* 10: 551-554.
19. Chuang, S.-M., Wang, I.-C., Yang, J.-L. (2000) Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* 21(7): 1423-1432.
20. Cicconi S, Ventura N, Pastore D, Bonini P, Di Nardo P, Lauro R, Marlie LN. (2003). Characterization of apoptosis signal transduction pathways in HL-5 cardiomyocytes exposed to ischemia/reperfusion oxidative stress model. *Journal of Cell Physiology* 195:27-37.
21. Cornelison D. D., Wold B. J. (1997) *Journal of developmental biology*, 191(2):270-83.
22. Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103: 239-252.
23. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat cell biol*, 9(3):255-67.
24. Denhardt DT (1996) Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochemistry Journal* 318 (Pt 3): 729-47.
25. Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J (1996) A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature*. 383: 547-50.
26. Dougherty CJ, Kubasiak LA, Prentice H, Andreka P, Bishopric NH, Webster KA. Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. *Biochem. J.* 2002, 362:561-571.
27. Dunn C., Wiltshire C., MacLaren A., Gillespie D.A.F. (2002) Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signaling via the c-Jun transcription factor. *Cell Signaling*, 14: 585-593.
28. Edmunds, J.W., Mahadevan, L.C. (2004) *Journal of cell science* 117: 3715-3723.
29. Elsasser A, Suzuki K, Lorenz-Meyer S, Bode C, Schaper J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol.* 2001 May-Jun; 96(3):219-26.
30. Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. P38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes and development* 2005, 19:1175-1187.
31. Enslin H., Raingeaud J., Davis R.J. (1998) Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol Chem*, 273: 1741-1748.
32. Franklin, R.A., McCubrey, J.A. (2000) Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 14: 219-234.
33. Fuertes MA, Castilla J, Perez JM (2003). Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Current Medicinal Chemistry*. 10:257-266.
34. Gabrieli I., Sherman I., Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of heart nuclear DNA fragmentation. *J cell biol* 1992; 119:49501.

35. Gredinger E, Gerber AN, Tamir Y, Tapscott J, Bengal E. Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *The journal of biological chemistry* 1998; 17:10436-1044.
36. Green, D.R., Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312.
37. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA (2002) The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50:589-610.
38. Guan, K.L. (1994) The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cellular signaling* 6: 581-589.
39. Guo K., Wang J., Andres V., Smith R. C., Walsh K. (1995) MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation. *Molecular and cellular biology*, p. 3823-3829.
40. Haotum A. O., Gross-Mesilaty S., Breitschop K., Hoffman A., Gonen H., Ciechanover A., Bengal E. (1998). Degradation of myogenic transcription factor MyoD by the ubiquitin pathway in vivo and in vitro: regulation by specific DNA binding. *Molecular and cellular biology*, p. 5670-5677.
41. Hawke T. J., Garry J. D. (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of applied physiology*, 91:534-551.
42. He H, Li HL, Lin A, Gottlieb RA. Activation of the JNK pathway is important for cardiomyocyte death in response to stimulated ischemia. *Cell Death and Differentiation* 1999, 6:987-991.
43. Hirata H., Takahashi A., Kobayashi S. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *Journal of experimental medicine*, 1998; 187:587-600.
44. Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., Deventer., S. J. H. (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*. 52: 144-151.
45. Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N (2002). Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 129, 2987-2995.
46. Irintchev A, Zweyer M, Wernig A. Cellular and molecular reactions in mouse muscles after myoblast transplantation. *J Neurocytol.* 1995 Apr;24(4):319-31.
47. Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DW, Fedorov YV, Olwin BB. The p38 α / β MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *The journal of cell biology* 2005, 1:105-116.
48. Jones S.W., Baker D. J., Gardiner S. M., Bennet T., Timmons J. A., Greenhaff P. L. (2004) The effect of the β 2-adrenoreceptor agonist prodrug BRL-47672 on cardiovascular function, skeletal muscle myosin heavy chain, and MyoD expression in the rat. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 311: 1225-1231.
49. Kaiser RA, Liang Q, Bueno O, Huang Y, Lackey T, Klevitsky R, Hewett TE, Molkentin JD. Genetic inhibition or activation of JNK1/2 each protect the myocardium from ischemia-reperfusion-induced cell death *in vivo*. *JBC Papers in Press*, 2005.
50. Kam, P.C.A., Ferch, N.I. (2000) Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 55, 1081-1093.
51. Kaneko S, Feldman R. I., Lu Yu, Wu Z, Gritsko T., Shelley S. A., Nicosia S. V., Nobori T., Cheng J.Q. (2002) Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. *The journal of biological chemistry*, p. 23230-23235.
52. Kerkhoff E, Rapp UR. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*. 1998 Sep 17;17(11 Reviews):1457-62.

53. Kumar D, Lou H, Singal PK. Oxidative stress and apoptosis in heart dysfunction. *Herz*. 2000; 27(7):662-8.
54. Kyto V, Saraste A, Saukko P, Henn V, Pulkki K, Vuorinen T, Voipio-Pulkki LM. (2004) Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis. *American Journal of Cardiology* 94:746-50.
55. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nature Biotechnology* 2005; 23:845-856.
56. Laken, H.A., Leonard, M.W. (2001) Understanding and modulating apoptosis in industrial cell culture. *Cur. Opin. Biotech.* 12: 175-179.
57. Laugwitz KL, Moretti A, Weig HJ, Gillitzer A, Pinkernell K, Ott T, Pragst I, Stadele C, Seyfarth M, Schomig A, Ungerer M. (2001) Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium. *Human Gene Therapy* 12:2051-63.
58. Le-Niculescu H, Bonfoco E, Kasuya Y, Claret FX, Green DR (1999). Withdrawal of survival factors results in activation of JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol cell biol* 19:751-763.
59. Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advanced Cancer Research*.74: 49-139.
60. Lim C.C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G.M. et al. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 8290-9.
61. Mackay K, Mochly-Rosen D (1999). An inhibition of p38 mitogen activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J Biol Chem* 274:6272-6279.
62. Mao Z, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286(5440):785-790.
63. Martin S. J., Green D. R. Protease activation during apoptosis: Death by a thousand cuts. *Cell* 1995, 82:346-352.
64. Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation*. 2001 Jul 17;104(3):330-5.
65. Mauro A. (1961) Satellite cells of skeletal muscle fibers. *Journal of Biophysics Biochemistry Cytology* 9:493-5.
66. Meldrum DR, Dinacello CA, Cleveland JC (1998). Hydrogen peroxide induced tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a p38 mitogen-activated protein kinase dependent mechanism. *Surgery* 124(2):291-6.
67. Minden, A., Karin, M. (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1333: F85-F104.
68. Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A (1998). Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273(26):16415-20.
69. Olguin H. C., Olwin B. B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* 2004; 275(2):375-88.
70. Ono, K., Han, J. The p38 signal transduction pathway activation and function. *Cellular signaling* 12: 1-13.
71. Ortiz, A., Cuadrado, S.G., Lorz, C., Egido, J. (1996) Apoptosis in renal disease. *Frontiers in Bioscience* 1: d30-47.
72. Ostrovsky O., Bengal E. (2003) *The journal of biological chemistry*, p. 21221-21231.
73. Oustanina S., Hause G., Braun T. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cell but not their specification. *EMBO j* 2004; 23 (16):3430-9.

74. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO Journal* 10:885-92.
75. Pouzet B, Vilquin J. T., Hagege A. A., Scorsin M., Messas E., Fiszman M., Schwartz K., Menasche P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblast: can tissue processing be optimized? *Circulation* 2000;102-210.
76. Rincon, M., Enselen, H., Raugeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Devis, R.J., Flavell, R.A. (1998) Interferon- γ expression by Th1 effector cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *The EMBO journal* 17(10): 2817-2829.
77. Rodriguez M, Lucchesi BR, Schaper J. (2002) Apoptosis in myocardial infarction. *Annual Medicine* 34:470-9.
78. Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., Wagner, E.F. (2004) Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Molecular cell* 15: 713-725.
79. Sabapathy, K., Wagner, E.F. (2004) JNK2 a negative regulator of cellular proliferation. *Cell cycle* 3(12): 1520-1523.
80. Sanches-Perez, I., Murguia, J.R., Perona, R. (1998) Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene* 16(4):533-540.
81. Sawyer D.B., Fukazawa R., Arstall M.A., Kelly R.A.. Daunorubicin-Induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes Is Inhibited by Dexrazoxane. *Circulation Research*. 1999; 84: 257-65.
82. Schultz R, Aker S, Belosjorow S, Konietska I, Rauen U, Heusch G. Stress kinase phosphorylation is increased in pacing-induced heart failure in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285:84-90.
83. Serna L. I., Roy K., Carlson K. A., Imbalzano A. N. (2001) MyoD can induce cell cycle arrest but not muscle differentiation in the presence of dominant negative ASI/SNF chromatin. *The journal of biological chemistry*, pp. 41486-41491.
84. Sgonc, R., Gruber, J. (1998) Apoptosis detection: an overview. *Experimental Gerontology* 33 (6): 525-533.
85. Siminek T., Klimtova I., Kaplanova J., Mazurova Y. et al. Rabbit model for in vivo study of anthracycline-induced heart failure and for the evaluation of protective agents. *Eur. J. Heart Fail.* 2004; 6: 377-87.
86. Slee E. A., Hartle M. T., Kluck R. M. Ordering the cytochrome c initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8 and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J cell biol* 1999, 144:281-292.
87. Tatsumi R., Hattori A., Ikeuchi Y., Anderson J. E., Allen R. E. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Mol biol cell* 2002; 13:2909-18.
88. Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barrett, T., Davis, R.J. (1997) Mitogen-activated protein kinase 7 is an activator of the c-Jun NH₂-terminal kinase. *Cell biology* 94: 7337-7342.
89. Wang Y, Huang S, Sak VP, Ross JJ, Brown JH, Han J, Chien KR (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J biol chem* 273:2161-2168.
90. Werlen G, Hausmann B, Naeher D, Palmer E (2003) Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science*. 299:1859-63.
91. Zammit P. S., Golding J. P., Nagata Y., Hudon V., Partridge T. A., Beauchamp J. R. Muscle satellite cell adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal. *J cell biol* 2004; 166(3):347-57.

92. Zammit P. S., Partridge T. A., Yablonka-Reuveni Z. (2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *JHC exPRESS*
93. Zarubin T and Han J (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* 15: 11-18.
94. Zbinden G, Bachmann E, Holderegger C. Model systems for cardiotoxic effects of anthracyclines. *Antibiot Chemother.* 1978;23:255-70. Review.
95. Zechner D, Craig R, Hanford DS, McDonough PM, Sabbadini RA, Glembotski CC (1998). MKK6 inhibits apoptosis in neonatal cardiac myocytes via a p38 MAP kinase – dependent mechanism. *J Biol Chem* 273:8232-8234.
96. Zhenguo WU, Pamela J. Woodring, Kunjan S. Bhakta, Kumiko Tamura, Fang Wen, James R. Feramisco, Michael Karin, Jean Y. J. Wang, Pier Lorenzo Puri. (2000) p38 and extracellular signal – regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Molecular and cellular biology*, p. 3951-3964.
97. Zhu W, Zou Y, Aikawa R, Harada K, et al. MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation* 1999, Nov 16;100(20):2100-7.

