

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
AUGALŲ FIZIOLOGIJOS IR MIKROBIOLOGIJOS KATEDRA
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

Irma Stašiauskaitė

*Cytochalazino E ir deoksinivalenolio veikimo mechanizmų tyrimas
MH-22A ir Jurkat linijų ląstelėse*

Baigiamasis magistro darbas

Darbo vadovės
dr. V. Bukelskienė
dakt. D. Baltriukienė

Vilnius, 2006

TURINYS

SUTRUMPINIMAI.....	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	6
1.1. Mikotoksinai.....	6
1.1.1. Citochalaziniai, jų biologinis aktyvumas; citochalazinas E.....	6
1.1.2. Deoksinivalenolis – paplitimas, veikimo mechanizmas.....	9
1.2. Ląstelės ciklas.....	11
1.3. Apoptozė ir nekrozė – pagrindinės ląstelių žūties formos.....	14
1.4. Apoptozės reguliacija, pagrindiniai mechanizmai.....	15
1.5. MAPK signalo perdavimo kelias.....	18
1.5.1. ERK1/2 signalo perdavimo kelio vaidmuo ląstelių proliferacijoje.....	19
1.5.2. JNK signalo perdavimo kelias.....	20
1.5.3. p38 signalo perdavimo kelias.....	21
1.6. c-Jun transkripcijos faktoriaus vaidmuo signalo perdavime.....	22
2. DARBO METODAI.....	25
2.1. Pastovių ląstelių auginimas <i>in vitro</i>	25
2.2. Auginimo intensyvumo nustatymas.....	26
2.3. Ląstelių gyvybingumo nustatymas.....	26
2.4. Priešprasminės <i>c-jun</i> sekos įvedimas.....	27
2.5. Ląstelių lizavimas.....	28
2.6. Baltymų nustatymas Bradford metodu.....	28
2.7. Baltymų elektroforezė.....	29
2.8. Imunoblotingas.....	30
2.9. Naudotos medžiagos.....	30
2.10. Statistinė duomenų analizė.....	31
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	32
3.1. Augimo intensyvumo ir gyvybingumo tyrimas skirtingos kilmės ląstelių populiacijose.....	32
3.1.1. Augimo intensyvumo ir gyvybingumo tyrimas Jurkat ląstelių populiacijoje.....	33
3.1.2. Augimo intensyvumo ir gyvybingumo tyrimas MH-22A ląstelių populiacijoje.....	34
3.2. Citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio mitogenų aktyvinamų proteinkinazių JNK ir p38 aktyvumui tyrimas.....	36
3.2.1. Citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio c-Jun N-galinės kinazės (JNK) aktyvumui tyrimas.....	37
3.2.2. Citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio p38 MAP kinazės aktyvumui tyrimas.....	40
3.3. Protoonkogeno <i>c-jun</i> vaidmens tyrimas citochalazino E ir deoksinivalenolio indukuojamuose tiriamųjų ląstelių žūties procesuose.....	42
3.3.1. Protoonkogeno <i>c-jun</i> raiškos tyrimas po citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio.....	43
3.3.2. <i>c-jun</i> vaidmens tyrimas panaudojant parentalines ir genetiškai modifikuotas MH-22A ląsteles.....	44
IŠVADOS.....	49
SUMMARY.....	50
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	51

SUTRUMPINIMAI

AIF – apoptozę indukuojantis faktorius;
AP-1 - transkripcijos faktorių šeima;
Apaf-1 - apoptozę indukuojantis faktorius 1;
AS - genetiškai modifikuotos MH-22A ląstelės, kuriose *c-jun* raiška iš dalies blokuojama;
ATF - aktyvuojantis transkripcijos faktorius
Bcl-2 – apoptozę reguliuojančių baltymų šeima;
Bcl-x_S, Bax, Bad, Bid, Bak - apoptozę skatinantys Bcl – 2 šeimos baltymai;
Bcl-2, Bcl-x_L – apoptozę slopinantys Bcl – 2 šeimos baltymai;
Cdc2 - nuo ciklinų priklausoma kinazė;
Cdk - nuo ciklinų priklausomos kinazės;
c-FLIP – kaspazės homologas, neturintis proteazės aktyvumo;
Cit c - citochromas c;
c-jun, c-fos, c-myc - protoonkogenai;
CRE - cAMP atsako elementas
CE – citochalazinas E;
DMEM – Dalbeko modifikuota Iglo (Eagle) ląstelių auginimo terpė;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
DON – deoksinivalenolis;
EGF- epiderminis augimo faktorius;
EGFR - epiderminio augimo faktoriaus receptoriaus;
ERK - ekstraląstelinio signalo reguliuojama proteino kinazė;
FADD – su FAS asocijuotas mirties domeno baltymas;
FasL - Fas receptoriaus ligandas;
JNK - c-Jun N-galinė kinazė;
JUN - genetiškai modifikuotos MH-22A ląstelės, kuriose *c-jun* raiška padidinta;
MAPK - mitogenų aktyvuojamos proteino kinazės;
NDS - natrio dodecilsulfatas;
MEM – modifikuota Iglo (Eagle) ląstelių kultivavimo terpė;
NF-κB - transkripcijos faktorius;
NGF - nervų augimo faktorius;
PAR – parentalinės, genetiškai nepakeistos MH-22A ląstelės;
p38 – mitogenų aktyvuojama proteino kinazė;
p53 - navikų augimą slopinantis baltymas, transkripcijos faktorius;
pRb – retinoblastomos baltymas;
Smac – antrasis mitochondrijų apoptozę aktyvinantis baltymas;
TNF - navikų nekrozės faktorius;
TNFα - transformuojantis augimo faktorius alfa;
TNFβ - transformuojantis augimo faktorius beta;
TRIS - 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis;
VEKT – genetiškai modifikuotos MH-22A ląstelės, kuriose *c-jun* raiška nepakitusi.

ĮVADAS

Lietuvoje, kaip ir visame pasaulyje, vis daugiau dėmesio skiriama maisto produktų kokybei ir saugumui. Jau praėjusio amžiaus antrojoje pusėje buvo pastebėta, kad įvairių rūšių mikromicetai, besivystydami ant augalinės kilmės žaliavų ir iš jų pagamintų produktų sintetina ir išskiria į aplinką įvairios cheminės sudėties antrinius medžiagų apykaitos produktus - mikotoksinus, kurių dalis labai pablogina maisto kokybę ir kelia pavojų žmonių sveikatai. Jie laikomi vienu iš svarbiausių žmonių ir gyvūnų sveikatos rizikos faktorių. Šiuo metu apskaičiuota, kad mikotoksinais yra užkrėsta daugiau nei 25% pasaulinio derliaus produkcijos. Daugelyje šalių mikotoksinų kiekis maisto produktuose ir pašaruose yra reglamentuojamas norminiais dokumentais. Mikotoksinai atsparūs terminiam apdorojimui, todėl gali būti randami maisto produktuose: miltuose, duonos gaminiuose, aluje. Šiuo metu identifikuota daugiau nei 400 mikotoksinų. Pagrindiniai toksinų producentai yra *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* bei kitų mikromicetų genčių grybai, kurių sintetinami mikotoksinai (aflatoksinas, ochratoksinas, zearalenonas, deoksinivalenolis, fumonizinas bei visa eilė kitų cheminių junginių) kelia didžiausią pavojų gyvūnų bei žmonių sveikatai. Daugiau nei 100 mikromicetų metabolitų gali sukelti vėžį, įtakoti embrionų vystymąsi bei sukelti įvairių organų fiziologinių funkcijų sutrikimą.

Tiek ekonominiu, tiek sveikatos požiūriu vienas pavojingiausių mikotoksinų yra *Fusarium* genties grybų sintetinamas deoksinivalenolis, plačiai paplitęs grūdinėse kultūrose ir iš jų pagamintuose produktuose. Šis mikotoksinas gali įtakoti gyvulių vaisingumą, sukelti virškinimo, įvairius nervų sistemos, imuninės sistemos sutrikimus. Kitas mikotoksinas – citochalazinas E gali inhibuoti ląstelės dalijimąsi bei baltymų sintezę, be to, kai kurių literatūros šaltinių teigimu, pasižymi nefrotoksiniu bei kancerogeniu veikimu.

Pastaruoju metu vis didėjantis dėmesys skiriamas šių medžiagų veikimo mechanizmų tyrimams tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. Suprantama, mikotoksinų veikimo molekulinį mechanizmą supratimas leistų tinkamai apsaugoti žmones ir gyvūnus nuo susirgimų, o susirgus padėtų parinkti efektyvias gydymo strategijas.

Darbo tikslas: įvertinti mikotoksinų - citochalazino E ir deoksinivalenolio - veikimo mechanizmus, panaudojant skirtingos kilmės bei genetiškai modifikuotas ląsteles.

Darbo uždaviniai:

- iširti citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikį kraujo bei kepenų kilmės ląstelių proliferacijai bei gyvybingumui;

- įvertinti tiriamų junginių poveikį c-Jun N-galinės (JNK) ir p38 MAP kinazės aktyvumui;
- panaudojant genetiškai modifikuotas ląsteles įvertinti *c-jun* vaidmenį ląstelėms atsakant į citochalazino E bei deoksinivalenolio poveikį.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mikotoksinai

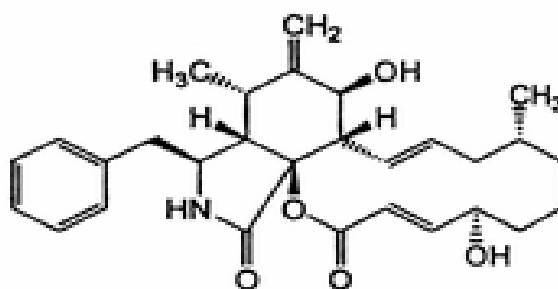
Susidarius optimalioms sąlygoms kai kurie mikroskopiniai grybai gali produkuoti toksiškas žmonėms ir gyvuliams medžiagas – mikotoksinus. Tai yra mažo molekulinio svorio antriniai mikroskopinių grybų apykaitos produktai. Pagrindiniai šių toksinų produkuotojai yra plačiai paplitę gamtoje *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* ir *Penicillium* genčių grybai, galintys augti ant pačių įvairiausių substratų [Demain., 1986]. Mikotoksinų sintezė (tipas ir kiekis) priklauso nuo mikromiceto genties, substrato sudėties, drėgmės, pH, temperatūros, deguonies, kitų esančių organizmų sąveikos bei kitų sąlygų [Albricht, 2001; Bhatnagar ir kt., 2002]. Toksikologiniu ir cheminiu požiūriu tai labai heterogeniška medžiagų grupė, kurią gana sunku ne tik apibūdinti, bet ir klasifikuoti. Šiuos metabolitus bandoma klasifikuoti pagal organus, kuriuos jie pažeidžia (hepatotoksinai, nefrotoksinai, neurotoksinai, imunotoksinai ir kt.), pagal klinikinius požymius, kuriuos jie sukelia (teratogenai, mutagenai, kancerogenai, alergenai), pagal cheminę struktūrą (laktinai, kumarinai ir kt.), pagal kilmę, priklausomai nuo to, kokia mikromicetų kultūra juos sintetina (pvz., *Aspergillus* toksinai, *Penicillium* toksinai ir kt.).

Mikotoksinų toksiškumas žmonėms ir gyvuliams gali pasireikšti ūmiai ar chroniškai. Jų veikimo pasėkoje gali sutrikti nervų sistemos, širdies ir kraujagyslių sistemos, kvėpavimo sistemos ar virškinamojo trakto veikla. Įvairūs mikotoksinai pasižymi labai skirtingais aktyvumais: priešvirusiniu ar priešbakteriniu veikimu, mutageniškumu, genotoksiškumu, teratogeniškumu, kancerogeniškumu. Kai kurių jų net maža koncentracija yra toksiška gyviems organizmams. Pavyzdžiui, keli miligramai T2 toksino gali sukelti gyvų organizmų žūtį. Yra mikotoksinų, pasižyminčių farmakologiniu aktyvumu, todėl šie junginiai bei jų dariniai gali būti naudojami kaip antibiotikai, augimo stimulatoriai ar kitokio pobūdžio vaistai. Be to, jie yra tyrinėjami kaip potencialios biologinės kovos priemonės [Bennet ir kt., 2003].

1.1.1. Citochalaziniai, jų biologinis aktyvumas; citochalazinas E

Citochalaziniai (gr. k. „*cytos*“ - ląstelė; „*chhalasis*“ – suglebimas, atsipalaidavimas) – tai įvairių mikromicetų genčių sintetinamų mikotoksinų grupė, pasižyminti gimininga chemine struktūra bei biologiniu aktyvumu. Žinoma daugiau nei 15 citochalazinių junginių, žymimų didžiosiomis raidėmis nuo A iki Z. Citochalaziniai A ir B yra *Helminthosporium dematioideum*, citochalaziniai C ir D - *Metarrhizium anisoplia*, citochalazinas E - *Rosellinia*

necatrix, citochalazinas F - *Helminthosporium dematioideum*, citochalazina H ir J - *Phomopsis paspali* metabolitai. Pirmieji citochalazina buvo atrasti 1964 m., ir jau nuo 1970 metų tapo svarbiu intensyvių citologinių tyrimų objektu. Struktūriškai citochalazina sudaryti iš fenilalanino ar triptofano liekanos, sujungtos su perhidroizoindolu, kuris, savo ruožtu, sujungtas su C₁₆-C₁₈ poliketo žiedine sistema (**1 pav.**). Pastarasis struktūrinis komponentas labiausiai varijuoja tiek sudėtimi, tiek dydžiu, ir yra svarbus apsprendžiant citochalazinių biologinį aktyvumą [Wells ir kt., 1981; Haindle ir kt., 2004].



1 pav. Citochalazinių struktūros modelis [Makioka ir kt., 2004].

Citochalazina pasižymi citostatiniu aktyvumu: jie inhibuoja ląstelės judėjimą, stabdo besidalijančių ląstelių citoplazmos, bet ne branduolio, dalijimąsi bei indukuoja apoptozę [Peterson ir kt., 2002; Haidle ir kt., 2004]. Citochalazina gali praeiti per ląstelės membraną ir įtakoti tokius procesus kaip monosacharidų, amino rūgščių, įvairių nukleozidų transportas per ląstelės membraną (citochalazina A ir B), baltymų sintezę (citochalazinas D), angiogenezę (citochalazinas E), fagocitozę, trombocitų agregacija ar hormonų sekrecija [Ornelles ir kt., 1986; Cooper, 1987]. Be to, citochalazina gali įtakoti vaisingumą, pasižymi teratogeniniu poveikiu [Singh ir kt., 1987].

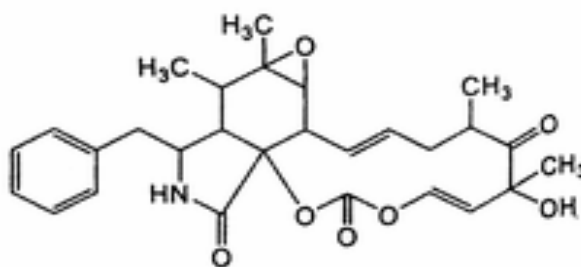
Tačiau labiausiai žinomas citochalazinių poveikis mikrofilamentams. Šie mikotoksinai jungdamiesi su greičiau augančiu aktino (+)-galu stabdo mikrovamzdelių susirinkimą. Viena citochalazino molekulė jungiasi su vienu aktino filamentu. Dėl šios priežasties citochalazina plačiai naudojami su aktinu susijusių procesų tyrimuose, analizuojant aktino filamentų dinamiką, ląstelės ciklo kinetiką ir chromosominius pažeidimus ląstelėse [Berger ir kt., 1997]. Literatūros duomenimis, intaktinėse, nepažeistose ląstelėse, citochalazinių poveikis ląstelės morfologijai, F-aktino kiekiui bei organizacijai gali skirtis [Mills ir kt., 2000].

Citochalazinių įtaka ląstelės ciklui. Nustatyta, kad šie mikotoksinai gali inhibuoti ląstelių adheziją, sąveikaudami su ląstelės paviršiaus makromolekulėmis. Tokiu būdu jie įtakoja membranos morfologinius pasikeitimus, ląstelės augimą bei judėjimą. Tyrimų metu buvo įrodyta, kad citochalazina depoliarizuoja aktino filamentus sutraukiamajame žiede telofazės metu, to pasekoje branduolys pasidalija nevykstant citokinezei ir formuojasi daugiabranduolės

ląstelės [Giganti ir kt., 2003]. Yra duomenų, kad citochalazinių poveikio pasėkoje ląstelės praranda branduolius [Goldman, 1972; Wei ir kt., 2002]. Aktino citoskeleto vientisumas turi būti išlaikomas visos G₁ ląstelės ciklo fazės metu, tai svarbu palaikant aukštą ciklino D1 lygį ir slopinant p27^{KIP1}, kuris veikia kaip neigiamas ciklino/Cdk komplekso aktyvumo reguliatorius ir gali stabdyti ląstelės augimą prieš restrikcijos arba ribos tašką, esantį vėlyvoje G₁ ląstelės ciklo fazėje [Huang ir kt., 2002]. Mažos citochalazinių koncentracijos stabdo ląstelės ciklą G₀/G₁ fazėje. To pasėkoje padidėja p53 raiška, padažnėja apoptozė [Rubstova ir kt., 1998].

Citochalazinių vaidmuo apoptozės indukcijoje. Aktino citoskeleto poliarizacija ir depoliarizacija yra susijusi su ankstyvais ir vėlyvais apoptozės įvykiais [Halaby ir kt., 2003; Veselká ir kt., 2003]. Manoma, kad su aktinu sąveikaujantys citochalaziniai gali keisti ne tik apoptozinės ląstelės morfologiją, bet ir inicijuoti programuotą ląstelių žūtį. Skirtingi citochalaziniai apoptozę indukuoja nevienodu dažniu. Tai susiję su jų skirtingu afiniškumu aktino filamentams [Suria ir kt., 1999]. Literatūros duomenimis, aktino citoskeleto ardymas gali įtakoti mitochondrijų funkcijas, padidinti mitochondrijų membranų pralaidumą. To pasėkoje išlaisvinamas citochromas c, kaspazės ir jų aktyvatorius Apaf-1. Visa tai susiję su apoptozės indukcija. Buvo iškelta hipotezė, kad citochalaziniai žinduolių ląstelėse gali inhibuoti gliukozės transporto sistemą, jungdamiesi su gliukozės transporteriu GLUT1 [Gottschalk ir kt., 2000]. Pelių embrioninėse ląstelėse ir hematopoetinės kilmės ląstelių kultūrose, neturinčiose GLUT1, stebima padidėjusi apoptozė, nežiūrint to, kad čia yra kitos GLUT izoformos (GLUT2, GLUT3, GLUT8) [Heiling ir kt., 2003]. Literatūros duomenimis, aktino citoskeleto depoliarizacija yra susijusi su p38 ir JNK MAPK signalinių kelių aktyvacija bei padidėjusia c-Jun raiška [Oren ir kt., 1999].

Citochalazinas E (CE) – tai *Aspergillus clavatus* ir *Rosellinia necatrix* metabolitas, besiskiriantis nuo kitų citochalazinių epoksido grupe ir turintis struktūrinių panašumų su angiogenezę slopinančiomis molekulėmis [Giganti ir kt., 2003]. Tačiau skirtingai nei kiti žinomi angiogenezės inhibitoriai (mikromicetų antrinis metabolitas, fumagilinas ir jo sintetiniai analogai, taip pat turintys savo struktūroje epoksido grupę), citochalazinas E neinhibuoja metionino aminopeptidazės 2 (MetAP2) [Zhang ir kt., 2002]. Ši epoksido grupė nulemia citochalazino E specifiškumą ir biologinį aktyvumą (**2 pav.**).

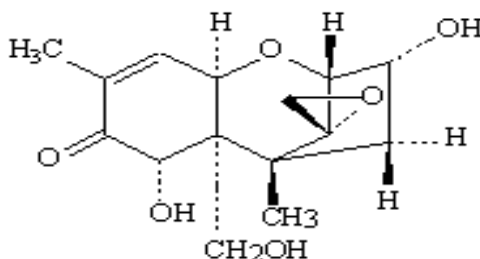


2 pav. Citochalazino E struktūra [Makioka ir kt., 2004].

Citochalazinas E yra vienas iš stipriausių šios grupės toksinų. Ypač toksiškas jis yra pelėms, žiurkėms, jūrų kiaulytėms. Histopatologinių tyrimų metu pastebėta, kad didelės šio mikotoksino koncentracijos sukelia kepenų, inkstų, blužnies, kasos, žarnyno ląstelių nekrozę, smegenų edemas, kraujagyslių sienelių pažeidimus [Glinsukon ir kt., 1975]. Mažesnės citochalazino E koncentracijos gali slopinti angiogenezę ir navikų augimą *in vivo* [Udagawa ir kt., 2000]. Be to, tyrimų metu nustatyta, kad šis citochalazinas stipriai ir selektyviai inhibuoja galvijų kapiliarinio endotelio (BCE) ląstelių proliferaciją *in vitro*. Šių ląstelių proliferacijos slopinimas yra dvejopas ir vyksta plačiose citochalazino E koncentracijų ribose: esant didelėms koncentracijoms, ląstelių proliferacijos inhibicija susijusi su aktino ardymu, tuo tarpu mažos koncentracijos slopina ląstelių augimą nuo epoksido grupės priklausomu mechanizmu [Udagawa ir kt., 2000].

1.1.2. Deoksinivalenolis – paplitimas, veikimo mechanizmai

Deoksinivalenolis (DON, arba vomitoksinas) – priklauso struktūriškai panašių mikotoksinų trichotecenų grupei ir yra išskiriamas iš *Fusarium* genties grybų (*Fusarium culmorum* ir *Fusarium graminearum*), plačiai paplitusių grūdinėse kultūrose, randamas iš jų pagamintuose produktuose (miltuose, aluje, salykle) (**3 pav.**). DON toksiškumą lemia molekulėje esantis 12, 13 epoksi žiedas.



3 pav. Deoksinivalenolio cheminė struktūra [Eriksen ir kt., 2004].

Tai vienas toksiškiausių trichotecenų, ląstelės lygmenyje galintis inhibuoti DNR, RNR, baltymų sintezę, sąveikauti su ląstelės organelėmis. Kai kurios Europos, Azijos, Pietų ir

Šiaurės Amerikos šalys turi DON apribojimus grūdinėms kultūroms, siekiančius 100 - 2000 µg/kg [Larsen ir kt., 2004]. Yra duomenų, kad kviečiuose aptikti 0,9 – 7,6 µg/kg DON kiekiai gali būti pavojingi gyvuliams bei žmogui [Maresca ir kt., 2002]. Šis mikotoksinas gali įtakoti gyvulių vaisingumą, sukelti virškinimo, įvairius nervų sistemos, imuninės sistemos sutrikimus. Nustatyta, kad DON gali pasižymėti tiek imunosupresiniu, tiek imunostimuliaciniu veikimu priklausomai nuo dozės ir poveikio trukmės. Imunosupresinis vaidmuo gali būti aiškinamas baltymų sintezės inhibicija, tuo tarpu imunostimuliacija gali būti siejama su įprastų reguliatorinių mechanizmų sutrikdymu [Rotter ir kt., 1996]. Atlikus tyrimus nustatyta, kad DON poveikio pasėkoje pakinta IgA gamyba pelių organizme. Šis poveikis panašus į žmonių, sergančių IgA nefropatija (glomerulonefritu) [Chung ir kt., 2003].

DON indukuoja apoptozę įvairiose ląstelių rūšyse *in vivo* ir *in vitro*, aktyvindamas kaspazę-3, skatindamas DNR fragmentaciją, chromatino kondensaciją bei aktyvindamas MAPK (mitogenų aktyvuojamos proteinų kinazės) šeimos kinazes. Nustatyta, kad DON eukariotinėse ląstelėse inhibuoja polipeptidiltransferazės reakciją, prisijungdamas prie 60S ribosominio subvieneto ir tuo būdu slopina baltymų sintezę. Polipeptidiltransferazės inhibitoriai gali būti ribotoksinio streso atsako priežastimi, todėl yra aktyvinamos JNK ir p38 – streso aktyvinamos MAP kinazės [Shifrin ir kt., 1999]. Žinoma, kad kai kuriose eksperimentinėse sistemose JNK/p38 kinazių aktyvacija reikalinga apoptozės indukcijai. Yra duomenų, kad DON gali sukelti Bax (proapoptotinio baltymo) translokaciją į mitochondrijas. Dėl to sukeliama citochromo c išlaisvinimas ir apoptozinė ląstelių žūtis, tačiau neįtakojamas mitochondrijų membranos pralaidumas [Zhou ir kt., 2005]. Literatūros duomenimis, DON poveikio metu pelės RAW 264.7 makrofagų ląstelėse gali būti aktyvinama proteinkinazė R (PKR) ir hematopoetinė ląstelės kinazė (Hsk). Šiuo atveju vyksta MAP kaskados aktyvinimas, padidėja p53 raiška, aktyvinama kaspazė-3 [Zhou ir kt., 2003; Pestka ir kt., 2004]. Naujesniais duomenimis, deoksinivalenolis gali indukuoti ciklooksigenazės-2 (COX-2) genų ekspresiją makrofaguose. Šis fermentas susijęs su uždegiminių mediatorių prostaglandinų sinteze, reguliuojama MAP kinazių lygmenyje [Moon ir kt., 2002]. Mažos DON koncentracijos taip pat gali aktyvinti ekstraląstelinių signalų reguliuojamas kinazes ERK1 ir ERK2. Literatūros duomenimis, DON sukelia ERK1/2 indukciją, susijusią su antiapoptotinio kelio ERK/AKT/p90Rsk/Bad iniciavimu makrofaguose [Zhou ir kt., 2005]. Šiuo atveju, ERK aktyvacija gali būti svarbi kaip ląstelės išgyvenimo signalas. Nustatyta, kad apoptozės dažnis stipriai padidėja inhibavus ERK specifiniu inhibitoriumi PD98059 ir paveikus DON [Yang ir kt., 2000]. Tačiau kitais literatūros duomenimis, ERK inhibicija beveik neturi įtakos apoptozės dažniui [Pestka ir kt., 2005].

Teigiama, kad citostatinis DON veikimas pasireiškia ląstelės ciklo sustabdymu G_0/G_1 fazėje [Fornelli ir kt., 2004].

1.2. Ląstelės ciklas

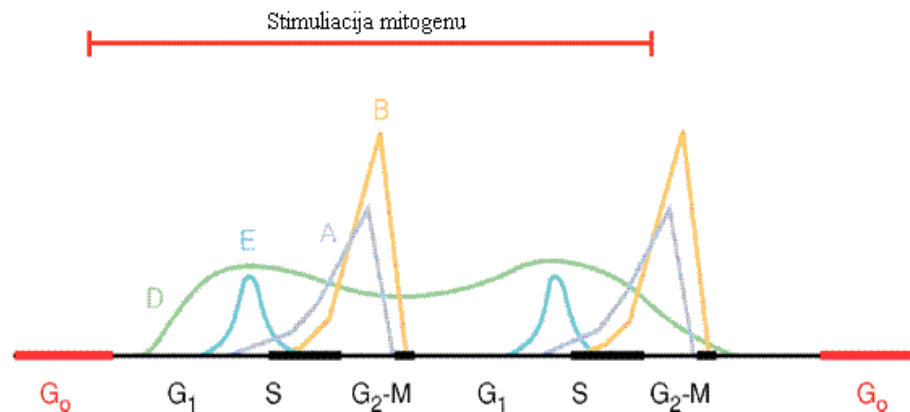
Ląstelės ciklas yra sudėtingas procesas, kurio metu vyksta įvairūs pokyčiai: ląstelė padvigubina savo genomą, auga ir pasidalija į dvi dukterines ląsteles. Procesai, vykstantys nuo vieno ląstelės ciklo dalijimosi iki kito, skirstomi į stadijas, kurių visuma ir vadinama ląstelės ciklu. Ląstelės ciklas skirstomas į keturias fazes: G_1 , S, G_2 ir M. Po ląstelės pasidalijimo atsiradusios dukterinės ląstelės yra G_1 fazėje. Šios fazės metu ląstelės auga, vyksta normali medžiagų apykaita, padvigubėja organelės, sintezuojama daug ląstelės baltymų, RNR, apvalkalėlio komponentai ir kitos makromolekulės. Po G_1 fazės seka S fazė, kurioje replikuojasi DNR, dvigubėja chromosomos. G_2 stadijos metu vyksta įvairūs mitozei reikalingi paruošiamieji metaboliniai procesai. Prasidedanti M fazė (mitozė) susideda iš dviejų procesų – branduolio pasidalijimo (kariokinezės) ir citoplazmos dalijimosi (citokinezės). Mitozės metu vyksta chromatino kondensacija, citoskeleto struktūros pokyčiai, chromosomų judėjimas vidurio plokštumos, o vėliau ir ląstelės polių link, be to, branduolio bei visos ląstelės pasidalijimas. Ląstelės ciklo dalis be mitozės vadinama interfaze.

Ląstelė palaiapsniui auga viso ciklo eigoje ir jos apimtis padvigubėja iki mitozės. Baltymų ir mRNR sintezė vyksta visos interfazės eigoje, o DNR replikacija – tik S fazės metu. Nesidalijančios ir ramybės būklėje esančios ląstelės, laikomos „išėjusios iš ciklo“ ir esančios ramybės fazėje G_0 [Cooper, 2003].

Ląstelės cikle vykstančią nuoseklią fazių kaitą kontroliuoja sudėtinga evoliucijos eigoje išstobulėjusi universali reguliacinė sistema. Mažiausia pažaida dalijimosi procesų metu sustabdo ląstelės slinktį ciklu tam tikrose vietose, kurios vadinamos kontrolės taškais. Pagrindinės ląstelės ciklo vietos, kuriose yra vykdoma DNR pažaidų kontrolė, yra perėjimai iš G_1 į S fazę ir iš G_2 į M fazę, taip pat kontrolės taškai S ir M fazėse [Kastan ir kt., 2004]. Kontrolės taške ląstelė sustabdo slinktį ciklu ir pašalina pažaidą arba visiškai pasitraukia iš ciklo.

Ląstelės slinktį iš vienos fazės į kitą reguliuoja proteinkinazių kompleksai. Tai heterodimeriniai baltymai. Jų reguliaciniai subvienetai vadinami ciklinais, o katalitiniai - nuo ciklinų priklausomomis kinazėmis, Cdk (ang. k. – *cyclin-dependent kinases*), kurios nepasižymi kinaziniu aktyvumu tol, kol nesusijungia su reguliaciniu subvienetu - ciklinu. Kiekviena Cdk gali asocijuoti su skirtingais ciklinais. Visų ciklinų koncentracija ciklo eigoje svyruoja, jų kiekis svarbus ląstelės ciklo slinkčiams.

Ląstelei slenkant ciklu sintetinami keturi ciklinai – D, E, A ir B. Ciklinai D ir E funkcionuoja G_1 fazėje, o ciklinai A ir B yra aktyvūs vėlesnėse ciklo fazėse - S ir G_2 (4 pav.). Ciklinų aktyvumai dažniausiai yra reguliuojami fosforilinimo ar ubikvitilino būdu. A ir B ciklinai N-gale turi homologines sekas, kurios sąlygoja šių ciklinų suirimą mitozės pabaigoje (ang. k. - *destruction box*). Ciklinų D ir E C-galuose yra PEST sekos, sąlygojančios jų gana trumpą gyvenimo trukmę lstelėje. Dėl šių priežasčių, ciklinų kiekis ir aktyvumai ląstelės ciklo eigoje nuolat kinta.



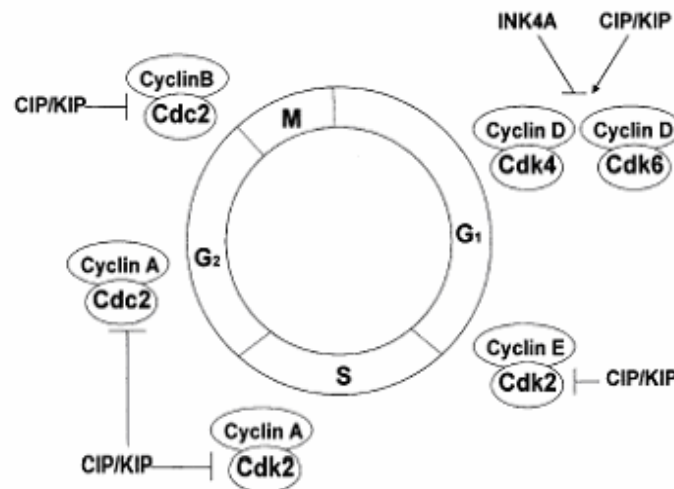
4 pav. Ciklinų raiškos kitimas ląstelės ciklo metu: D, E, A, B – ląstelės ciklinai, ekspresuojami skirtingų ląstelės ciklo fazių metu; G_0 , G_1 , S, G_2 ir M – ląstelės ciklo fazės [Sherr, 1996].

Ankstyvoje G_1 fazėje pirmiausia pradeda veikti ciklinai D, sudarantys kompleksus su nuo ciklinų priklausomomis kinazėmis Cdk4 bei Cdk6 ir, tokiu būdu, inicijuojantys ląstelės ciklo pradžią (5 pav.). Žinomi trys D tipo ciklinai: D1, D2 ir D3. Šių ciklinų raiška priklauso nuo mitogeninių veiksnių. Ciklino D1 ekspresija suaktyvėja ląstelei paliekant ramybės fazę G_0 ir pereinant į ciklo fazę G_1 . Tai įvyksta veikiant augimo faktoriams [Coleman ir kt., 2004]. Ciklino D/Cdk4 (arba Cdk6) kompleksai reikalingi ląstelės slinkčiai per G_1 fazę ir įsijungimui į S fazę. Be to, ciklino D/Cdk4 (arba Cdk6) kompleksas gali fosforilinti retinoblastomos geno produktą pRb, kuris yra vėžio supresorius ir vienas pagrindinių ląstelės ciklo reguliatorių [Tamrakar ir kt., 2000; Huynh ir kt., 2004]. Fosforilintas pRb, jis tampa neaktyvus ir negali blokuoti ląstelės ciklo genų transkripcijos. Šiuo atveju, yra atpalaiduojamas faktorius E2F, kurį nefosforilintas pRb laiko prisijungęs, inhibuodamas jį alosteriškai. Laisvas E2F atlieka transkripcijos faktoriaus vaidmenį, aktyvindamas ankstyvojo atsako genus, reikalingus DNR replikacijai bei fermentus, būtinus DNR metabolizmui ir sintezei [Coleman ir kt., 2004]. Šis etapas ląstelės cikle, kai įveikiamas baltymo pRb reguliuojamas kontrolės taškas, vadinamas ribos arba R tašku. Jį įveikusios ląstelės yra pasiruošusios pradėti DNR replikaciją. Hiperfosforilintoje (neaktyvioje) formoje pRb toliau palaiko ciklino A/Cdk2 ir ciklino B/Cdk1

kompleksai. M fazės pabaigoje pRb greitai defosforilinamas ir, savo ruožtu, susijungdamas su transkripcijos faktoriumi E2F, slopina ląstelės dalijimąsi.

Vėlyvoje G₁ fazėje susidaro ciklino E/Cdk2 kompleksai. Be to, G₁/S riboje pasirodo ir ciklino A/Cdk2 kompleksai. Šie du kompleksai yra svarbūs DNR replikacijos iniciacijai ir užbaigimui: ciklino E/Cdk2 kompleksas dalyvauja DNR sintezės iniciacijoje, o ciklino A/Cdk2 kompleksas skatina ląstelės slinktį S faze. Pastarasis ciklinas yra sintetinamas ir G₂ fazės metu. Šiuo atveju jis sudaro kompleksą su Cdc2. Vėliau indukuojama ciklino B ekspresija. Literatūros duomenimis, ciklino A/Cdc2 kompleksas gali inicijuoti chromosomų kondensaciją ir kitus ankstyvos profazės įvykius [Takizawa ir kt., 2000].

M fazės pagrindinė kinazė Cdk1 (kitaip dar vadinama Cdc2) jungiasi su ciklinu B, skatindama ląstelės slinktį iš G₂ fazės į M fazę. Šis kompleksas vadinamas mitozę skatinančiu veiksnium arba MPF (ang. k. – *mitosis-promoting factor*). Šis veiksnys tiesiogiai arba netiesiogiai katalizuoja eilę fosforilinimų: branduolio lamino, histoninių ir nehistoninių DNR baltymų. Be to, fosforilinimo metu yra reguliuojamas ir chromatidžių atsiskyrimas anafazės metu. M fazės pabaigoje ciklinas B yra suardomas veikiant ubikvitinazei ir MPF tampa neaktyviu.



5 pav. Ląstelės ciklas ir jo reguliacija; ciklinų/ Cdk kompleksų kitimas ciklo metu. G₁, S, G₂, M – ląstelės ciklo fazės; CIP/KIP ir INK4 – baltymai, inhibuojantys Cdk [Garret, 2001].

Žinduolių ląstelėse nuo ciklinų priklausomas kinazės inhibuoja Cdk inhibitoriai (CKI). Pagal struktūrą CKI skirstomi į dvi šeimas: Ink4 (ang. k. - *cdk4 inhibitor*) ir CIP/KIP (ang. k. - *cdk inhibitor protein/kinase inhibitor protein*) [Wainwright ir kt., 2001]. Ink4 šeimai priskiriami

4 baltymai (p15^{INK4A}, p16^{INK4B}, p18^{INK4C}, p19^{INK4D}), kurie pasižymi specifine sąveika su Cdk4 bei Cdk6 kinazėmis. Susidarius stabiliam inhibitoriaus/kinazės kompleksui yra blokuojama

šių kinazių sąveika su ciklinu D. CIP/KIP šeimą sudaro p21^{CIP1}, p27^{KIP1} ir p57^{KIP2} baltymai. Priešingai nei INK4 šeimos inhibitoriai, CIP/KIP baltymai jungiasi ne vietoj ciklino, o su ciklino/Cdk kompleksu. Nors CIP/KIP šeimos baltymai sąveikauja su platesniu Cdk ratu (Cdk4, Cdk6, Cdk 2, Cdc2), jie blokuoja tik Cdk2 aktyvumus [Johnson ir kt., 1999; Garret, 2001].

1.3. Apoptozė ir nekrozė - pagrindinės ląstelių žūties formos

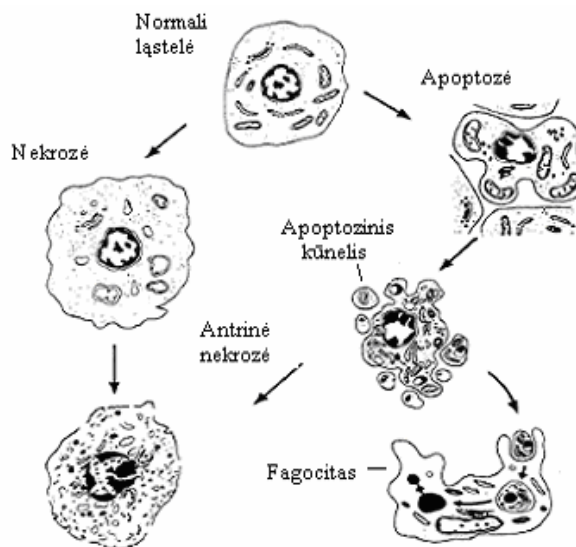
Ląstelių žūtis priklausomai nuo žalojančio veiksnio stiprumo, jo veikimo trukmės, žuvimo proceso trukmės ir ATP atsargų ląstelėje išsekimo laipsnio gali vykti dviem skirtingais mechanizmais: apoptozės arba programuotos ląstelių žūties ir nekrozės [Burek ir kt., 2003].

Apoptozė – tai aktyvi, genetiškai reguliuojama ląstelės žūties forma, vykstanti fiziologinėmis sąlygomis. Ji gali būti apibūdinama specifiniais morfologiniais, biocheminiais, molekuliniais įvykiais, susijusiais su citoplazmos, plazminės membranos ir branduolio pokyčiais. Apoptozė yra svarbi daugialąsčių organizmų vystymuisi: embriogenezėje, ontogenezėje, bręstant imuninės sistemos ląstelėms ir kt. Sutrikusi apoptozės iniciacija arba jos nebuvimas gali būti daugelio ligų - vėžio, autoimuninių susirgimų, virusinių infekcijų - priežastimi [Gupta, 2003]. Apoptozei vykti būtina energija ir *de novo* makromolekulių sintezė, o, išsekus energetiniams ląstelės ištekliams, įvyksta nekrozė [Syntichaki ir kt., 2002].

Ankstyvos apoptozės metu, ląstelė dehidratuoja, susitraukia, prarandami ryšiai su kitomis ląstelėmis, vyksta tolygi chromatino kondensacija, o vėliau ir branduolio DNR fragmentacija [Barišić ir kt., 2003]. Branduolio fragmentai su citoplazmos likučiais supakuojami į plazminę membrana apgaubtus apoptozinius kūnelius. *In vivo* šiuos kūnelius atpažįsta ir fagocituoja makrofagai. Uždegiminis procesas nepasireiškia, plazminė membrana išlieka vientisa iki proceso pabaigos (**6 pav.**). *In vitro* apoptoziniai kūneliai išbrinksta ir yra lizuojami. Ši paskutinė ląstelės žūties forma *in vitro* vadinama „antrine nekroze“.

Nekrozė - pasyvus procesas, kurio nekontroliuoja jokie homeostatiniai mechanizmai. Nekrozės metu naujų baltymų sintezė nevyksta [Syntichaki ir kt., 2002]. Tai dažniausiai pasireiškiantis žūties būdas, veikiant įvairiems egzogeniniams dirgikliams ar tokiems stresams, kaip išemija bei cheminis pažeidimas. Jos metu pažeidžiama membrana ir ląstelė nesugeba palaikyti homeostazės. Vanduo ir kiti ekstraląsteliniai jonai skverbiasi į ląstelės vidų. Nekrozės metu padidėja ląstelės tūris, išbrinksta organoidai, ypač mitochondrijos. To pasėkoje įvyksta ląstelės lizė. Citoplazmos turinys ir įvairūs lizosominiai fermentai išsiskiria į ekstraląstelinį skystį. *In vivo* nekrozę dažnai lydi įvairūs audinių pažeidimai, sukelti

uždegiminį atsaką [Nelson ir kt., 2004]. Branduolyje pokyčiai nežymūs, chromatinas išlieka nepakitęs, vyksta atsitiktinė DNR fragmentacija. Nekrotinė ląstelių žūtis gali vykti ir ląstelių kultūrose dėl spartėjančios apoptozės, kur nėra fagocituojančių ląstelių [Lawen, 2003].



6 pav. Pokyčiai ląstelėje nekrozės (kairėje) ir apoptozės (dešinėje) metu [www.cred.mdanderson.org/surp/resources/Apoptosis.pdf].

1.4. Apoptozės reguliacija, pagrindiniai mechanizmai

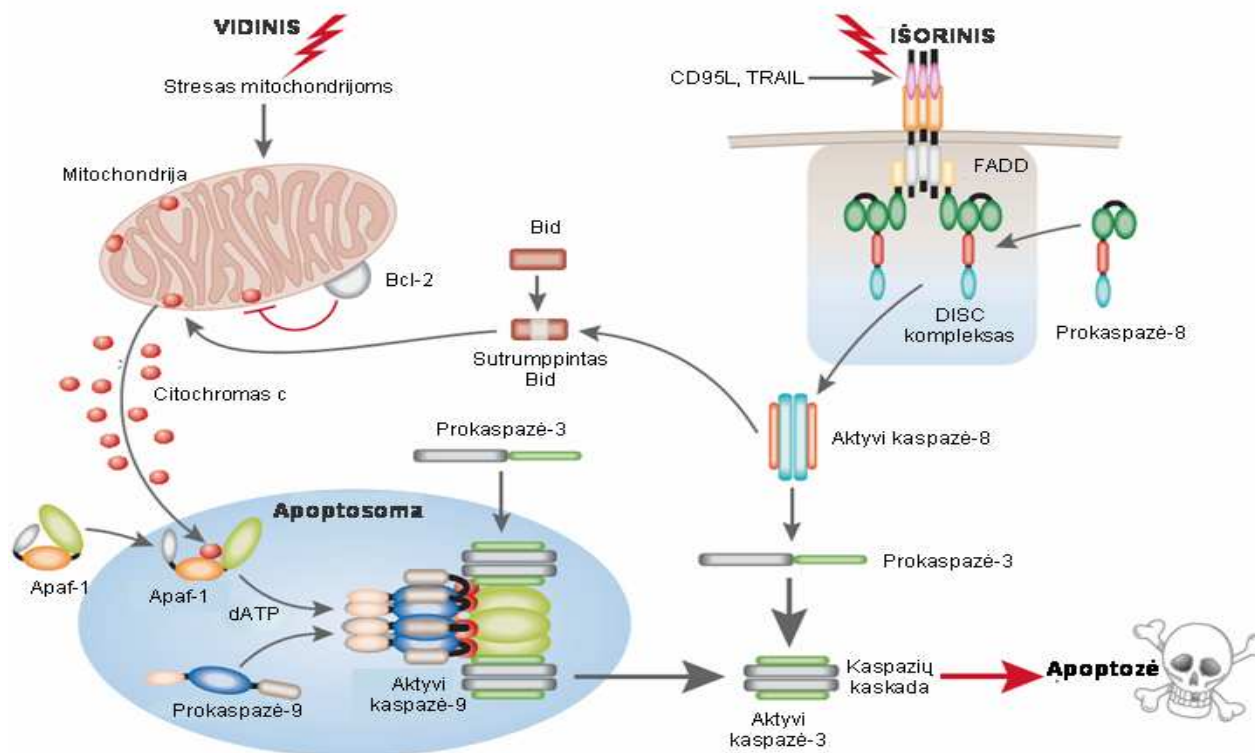
Apoptozė yra genetiškai kontroliuojamas ir evoliucijos eigoje nedaug tepakitęs procesas, kurio dalyviai tarpusavyje sąveikauja tam tikra seka. Ankstyvos apoptozės metu vyksta tam tikri pasikeitimai ląstelės paviršiuje: atsiranda pokyčiai glikoproteinų ir glikolipidų grandinėse, fosfatidilserinas translokuojamas iš vidinės membranos pusės į išorinę, o tai tarnauja atpažinimo signalu fagocitinėms ląstelėms [Azuma, 2002].

Daugumą morfologinių pokyčių programuotos ląstelės žūties metu lemia kaspazės (cisteino proteazės). Ląstelėje jos saugomos kaip neaktyvios prokaspazės, kurios yra aktyvinamos jas skaldant. Šiuo metu žinduolių audiniuose identifikuota keturiolika kaspazių. Kaspazės substratus skelia ties asparto rūgštimi (Asp-Xxx), esančia arčiau C-galo nuo atpažįstamo fragmento. Kaspazių taikiniais tampa baltymai, dalyvaujantys transkripcijoje, DNR replikacijoje, DNR reparacijoje [Lawen, 2003]. Be to, kaspazių poveikio pasėkoje yra aktyvinamos nuo Ca^{2+} ir Mg^{2+} priklausomos endonukleazės, kurios suskaldo branduolio DNR į 50-200 bp fragmentus. Šis procesas vadinamas internukleosomine DNR fragmentacija. Tai vienas būdingiausių apoptozės bruožų [Barišić, 2003].

Kaspazės, dalyvaujančios apoptozės iniciacijoje, skirstomos į dvi grupes: iniciatorinės ir efektorinės. Iniciatorinės kaspazės yra aktyvinamos atsakant į proapoptozinį poveikį. Jos, savo ruožtu, aktyvina efektorines kaspazes. Šiuo metu geriausiai ištirti du apoptozės iniciacijos keliai: išorinis (receptorinis) ir vidinis (mitochondrinis) (7 pav.).

Išorinio (receptorinio) apoptozės kelio metu pašalinamos viruso infekuotos arba vėžinės ląstelės, o taip pat limfocitai imuninio atsako pabaigoje. Šiuo atveju yra aktyvinami receptoriai vadinami mirties receptoriais: TNF, Fas. Šie receptoriai turi cisteino turtingą išorinį domeną, kuris reikalingas ligando prisijungimui bei intraląstelinį domeną DD (ang. k. - *death domain*), reikalingą apoptozinio signalo perdavimui [Rossi ir kt., 2003]. Ligandui prisijungus prie mirties receptoriaus, pastarojo viduląstelinis domenas DD sąveikauja su adapteriniais baltymais, kurie turi mirties efektorinius domenus DED (ang. k. - *death-effector domain*), reikalingus tolimesniam signalo perdavimui. Fas receptorių, dar žinomas kaip CD95 arba Apo-1 yra transmembraninis glikoproteinas, aktyvinamas Fas ligando (FasL). Aktyvuotų Fas receptorių viduląstelinis domenas DD rišasi su baltymų adapterių - FADD (ang. k. - *Fas associated death domain*) atitinkamais DD motyvais ir suformuoja trimerinį mirties signalą indukuojantį kompleksą (DISC) (ang. k. - *death inducing signaling complex*), į kurio sudėtį dar įeina prokaspazė-8 ir prokaspazė-10. Kaspazės-8 aktyvaciją blokuoja kaspazės homologas c-FLIP [Hengartner, 2000; Thorburn, 2004]. Aktyvi kaspazė-8 kerpa ir aktyvina proapoptozinį Bcl-2 šeimos baltymą Bid. Gautas 15 kDa C-galo fragmentas translokuojamas į mitochondrijas ir indukuojamas citochromo c išlaisvinimas. To pasėkoje aktyvinama kaspazė-9 [Zeiss, 2003; Papadakis ir kt., 2006]. Kitas receptorių yra TNF, kurį aktyvina su TNF susijęs apoptozę indukuojantis ligandas (TRAIL) (ang. k. *tumor necrosis (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*) [Kuwana ir kt., 2003]. Neretai išorinio mirties receptorių kelio nepakanka ląstelei sunaikinti. Šiuo atveju netiesiogiai aktyvinamas vidinis (mitochondrijų) apoptozės kelias.

Mitochondrinį apoptozės iniciacijos kelią aktyvina daugybė įvairių dirgiklių – chemoterapinės medžiagos, UV radiacija, streso molekulės, augimo hormonų trūkumas ir kt. Mitochondrijų tarpmembraninėje ertmėje lokalizuotos įvairios molekulės (citochromas c, kai kurios prokaspazės, adenilato ciklazė 2, endoG, Diablo/Smac, Omi/HtrA2 ir AIF), kurios išsilaisvinamos padidėjus mitochondrijų išorinės membranos pralaidumui [Gupta, 2003].



7 pav. Apoptozės keliai: išorinis receptorių kelias, prasidedantis nuo Fas/CD95 ar TNF receptoriaus (dešinėje) ir vidinis, nuo mitochondrijų priklausantis, kelias (kairėje) [MacFarlane ir kt., 2004].

Citochromo c išsiskyrimas į citozolį yra vienas pagrindinių mitochondrinio apoptozės kelio etapų, kurio metu citochromas c, Apaf-1 ir kaspazė-9 formuoja apoptosomos kompleksą. To pasėkoje aktyvinamos efektorinės kaspazės-3, -6, -7, paleidžiama proteolitinė kaskada, sukianti ląstelių žūtį [Ott ir kt., 2002].

Apoptozės iniciacija neapsiriboja vien išoriniu ir vidiniu apoptozės aktyvacijos keliais, tačiau kiti keliai dar mažai ištirti. Nustatyta, kad žinduolių ląstelėse dėl mitochondrijų pralaidumo išsilaisvinę AIF (ang. k. - *apoptosis-inducing factor*) ir endoG nuo kaspazių nepriklausomu būdu gali sukelti DNR fragmentaciją ir chromatino kondensaciją [Kuwana ir kt., 2003]. Be to, neseniai nustatyta, kad proapoptozinis baltymas Bid gali būti aktyvinamas tokių proteazių, kaip granzimas B, lizosominės proteazės, ir to pasėkoje aktyvinti vidinį apoptozės kelią [Gupta, 2003].

Svarbūs programuotos ląstelių žūties reguliatoriai yra Bcl-2 šeimos baltymai, galintys skatinti (Bax, Bad, Bid, Bcl-2, Bim ir kt.) arba slopinti (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, A-1 ir kt.) apoptozės procesą. Bcl-2, Bcl-X_L dažniausiai konstitutyviai yra lokalizuoti mitochondrijų membranose, tuo tarpu Bax, Bid, Bim randamas sveikų ląstelių citozolyje [Papadakis ir kt., 2006]. Šie baltymai tarpusavyje sudaro homo- ir heterodimerus. Ląstelės likimas priklauso

nuo pro- ir antiapoptozinių baltymų santykio šiuose kompleksuose [Fesik, 2000; Orrenius S, 2004].

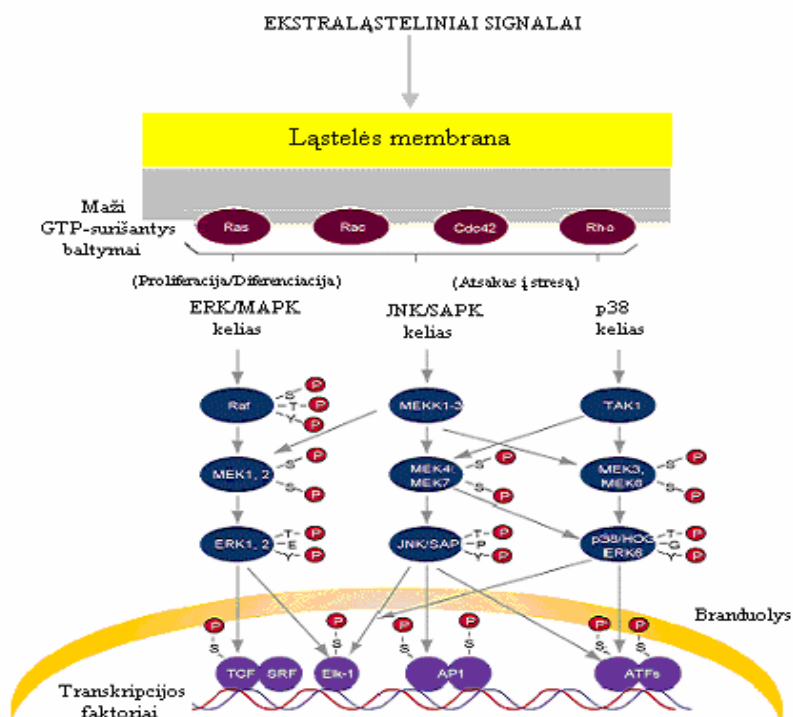
Apoptozės reguliacijai yra svarbus p53 baltymas. Tai vėžio supresorius ir transkripcijos faktorius, kontroliuojantis genų, susijusių su ląstelės ciklo eiga, apoptoze, DNR reparacija, angiogeneze, baltymų degradacija, raišką. p53 gali inicijuoti apoptozę aktyvindamas proapoptozinius Bcl-2 šeimos narius (Bax, Bak, PUMA, Noxa) ir slopindamas antiapoptozinius Bcl-2 baltymus (Bcl-2, Bcl-X_L), koduojančių genų raišką. Pakitęs Bcl-2:Bax santykis aktyvina vidinį apoptozės kelią. p53 kontroliuoja ir PIGs šeimos, kuri susijusi su ROS kontrole ir produkcija, genų raišką. Padidėjęs ROS kiekis taip pat gali aktyvinti mitochondrinį apoptozės kelią. Įdomu tai, kad mitochondrijos gali būti ir ROS šaltinis, ir taikynys [Simon ir kt., 2000; Blatt ir kt., 2001]. Be to, p53 aktyvina CD95 ir TRAIL-R2, tuo būdu indukuodamas nuo receptorių priklausomą apoptozę [Johnstone ir kt., 2002]. Vėžio supresoriaus p53, reguliuodamas už ląstelės ciklą atsakingų genų raišką, gali stabdyti ląstelės ciklą arba prieš DNR replikaciją (G₁ fazėje), arba prieš mitozę (G₂ fazėje) [Vousden, 2002].

1.5. MAPK signalo perdavimo kelias

Įvairūs signaliniai keliai leidžia ląstelei atitinkamai reaguoti į aplinkos pokyčius. Mitogenų aktyvinamų proteinkinazių (MAPK) (ang. k. - *mitogen activated protein kinases*) kaskada yra viena geriausiai ištirtų signalo perdavimo sistemų. Tai yra dvigubo specifiškumo serino/treonino kinazės, svarbios daugeliui ląstelės procesų: diferenciacijai, judėjimui, dalijimuisi ir žūčiai. Remiantis sekų panašumu, aktyvatoriais, substrato specifiškumu, MAP kinazės gali būti skirstomos į mažiausiai keturias grupes. Tai ekstraląstelio signalo reguliuojama kinazė (ERK), c-Jun N-galinė kinazė (JNK, taip pat žinoma, kaip streso aktyvinama proteinkinazė, SAPK), p38 MAPK ir ERK5 (**8 pav.**). ERK kaskadą aktyvina augimo faktoriai ir ji svarbi ląstelių augimui ir diferenciacijai. JNK ir p38 MAPK stimuliuoja genotoksinės medžiagos ir citokinai, tokiu būdu šios kinazės lemia atsaką į stresą. Literatūros duomenimis, laikina ERK aktyvacija lemia proliferaciją, tuo tarpu pastovi - sąlygoja ląstelių augimo sustabdymą ir diferenciaciją. Priešingai, laikina JNK ir p38 indukcija lemia ląstelių išgyvenimą, o pastovi - apoptozę [Robinson ir kt., 1997; Huh ir kt., 2004]. Tačiau yra duomenų, kad skirtingose ląstelių linijose, šios MAP kinazės gali pasižymėti skirtingomis funkcijomis.

MAPK signalinį kelią sudaro trijų kinazių kaskada. Pirmoji šios kinazių kaskados kinazė (MAPKKK) fosforilina ir aktyvina dvigubo specifiškumo kinazę MAPKK, kuri, savo ruožtu, fosforilina ir aktyvina MAPK. Visoms MAP kinazėms būdinga tai, kad jos

aktyvinamos fosforilinant Thr-X-Tyr motyvą (X yra Glu ERKs, Pro – JNK ir Gly – p38 MAPK) [Huh ir kt., 2004]. Svarbiausi MAPK taikiniai ląstelėje yra transkripcijos faktoriai, reguliuojantys genų raišką. Tik dalis aktyvių MAPK patenka į branduolį, kitos lieka citoplazmoje ir subląsteliniuose kompartmentuose. Šiuo atveju, MAP kinazės gali reguliuoti genų ekspresiją potranskripciniame lygmenyje, kuris apima taikinius citoplazmoje [Chang ir kt., 2001]. Priklausomai, nuo tarpląstelinių signalų, ląstelėje vienu metu gali veikti keli MAP kinazių signalo perdavimo keliai. Be to, MAP kinazių kelias glaudžiai sąveikauja su kitais signalo perdavimo keliais.



8 pav. MAP kinazių signalo perdavimo keliai [Jarvis ir kt., 1997].

1.5.1. ERK 1/2 signalinio kelio vaidmuo ląstelių proliferacijoje

Ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės ERK1 (42kDa) ir ERK2 (44kDa) – pirmosios atrastos MAP kinazės, apie kurias sukaupta ypatingai daug duomenų. Raf (MAPKKK) → MEK (MAPKK) → ERK1/2 (MAPK) signalinis kelias yra svarbus ląstelės proliferacijai, diferenciacijai, ląstelės ciklo reguliacijai bei išgyvenimui [Horbinski ir kt., 2005]. ERK aktyvina dvigubo specifinio kinazės MEK1 ir MEK2. Šis signalinis kelias dalyvauja ląstelei atsakant į augimo faktorių, citokininų, virusinės infekcijos, osmotinio streso, kancerogenų poveikį [Roux ir kt., 2004]. ERK šeimos kinazės reguliuoja įvairius baltymus (p90^{rsk}, citozolinę fosfolipazę A₂, EGFR ir kt.) juos fosforilindamos. Be to, aktyvios ERK patenka į branduolį, kur fosforilina transkripcijos faktorius (Elk-1, Ets1, Ets2) ir tokiu būdu

reguliuoja ankstyvo atsako genus. Šie genai koduoja baltymus, reikalingus ląstelės ciklo pradžiai.

ERK1 ir ERK2 ekspresuojami beveik visuose žinduolių audiniuose, tačiau ERK2 ekspresija paprastai yra didesnė. Yra duomenų, kad ERK1 ir ERK2 gali dalinai kompensuoti viena kitą. ERK1^{-/-} pelės yra gyvos, pasižyminčios tik nedideliais T ląstelių vystymosi defektais [Wolf ir kt., 2002]. Tačiau žymūs sutrikimai stebimi MEK1^{-/-} pelėse, kurios žūsta dėl defektų, susijusių su gimdos vaskuliarizacija [Chang ir kt., 2001]. Literatūros duomenimis, ERK1/2 MAPK skatina neuronų, raumenų ir T ląstelių diferenciaciją.

ERK kaskados aktyvinimas augimo faktoriais indukuoja ciklino D1 ekspresiją ankstyvoje G₁ ląstelės ciklo fazėje. Tokiu būdu skatinamas ciklino D/Cdk4 (arba Cdk6) kompleksų susidarymas. Susidarę kompleksai fosforilina pRB, to pasėkoje atpalaiduojamas faktorius E2F. Laisvas E2F atlieka transkripcijos faktoriaus vaidmenį, aktyvindamas ankstyvojo atsako genus. ERK kaskada taip pat supresuoja Cdk inhibitorių p27^{Kip1}, o tai svarbu ląstelės įėjimui į S fazę. [Zhang ir kt., 2002]. Literatūros duomenimis, ERK1/2 stimuliuoja DNR sintezę, fosforilindamas ir pakeisdamas karbamoilfosfatsintetazės II, dalyvaujančios pirimidinų biosintezėje, konformaciją [Chang ir kt., 2001].

1.5.2. JNK signalo perdavimo kelias

c-Jun N-galinėms kinazėms (JNK), kurios dar žinomos kaip streso aktyvinamos proteinkinazės (SAPK) priklauso trijų kinazių (JNK1,-2,-3) šeima, aktyvinama kinazių kaskados, sudarytos iš mitogenų aktyvinamos/ekstraląstelinio atsako kinazės 1 (MEKK1) ir mitogenų aktyvinamų proteino kinazių 4 ir 7 (MKK4/7). Pastarosios kinazės aktyvina JNK fosforilindamos Thr183 ir Tyr185 *in vivo* ir *in vitro* [Jin ir kt., 2005]. JNK signalo perdavimo kelias dalyvauja ląstelės atsake į citokinų, UV spinduliuotės, augimo faktorių, DNR žalojančių agentų poveikį.

JNK proteinkinazės 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 daugiau kaip 12 JNK izoformų. Aktyvios JNK fosforilina transkripcijos faktorius c-Jun, JunD ir ATF-2, kurie dalyvauja AP-1 komplekso formavime ir aktyvacijoje [Sabapathy ir kt., 1999].

Skirtingos JNK formos (JNK1, JNK2, JNK3) identiškai atsako į ekstraląstelinį stimulą, tačiau pasižymi nevienodu giminingu substratams *in vitro* [Ip ir kt., 1998]. JNK1 ir JNK2 skiriasi gebėjimu fosforilinti c-Jun. JNK2 pasižymi didesniu afiniškumu c-Jun bei su juo sudaro stabilesnį kompleksą *in vitro*, nei JNK1 [Minden ir kt., 1997; Sabapathy ir kt., 1999]. JNK1 ir JNK2 yra svarbios imuninio atsako reguliavime bei embriogenezeje. Nustatyta, kad

pelės neturinčios JNK1 ar JNK2 yra morfologiškai normalios, tačiau stebimi T ląstelių funkcijų defektai.

JNK vaidmuo ląstelės išgyvenimui ir žūčiai yra nevienareikšmis. Žinomas proapoptozinis, antiapoptozinis bei neutralus JNK veikimas. Eksperimentų metu nustatyta, kad JNK geba fosforilinti c-Myc, to pasėkoje indukuojamas apoptozės procesas. Be to, JNK gali indukuoti ląstelės žūtį reguliuodamas Fas-L ir p53 raišką [Jin ir kt., 2005]. Literatūros duomenimis, JNK gali inicijuoti ir mitochondrinį apoptozės kelią, slopindamas antiapoptozinių baltymų - Bcl-2 ir Bcl-X_L – aktyvumą. To pasėkoje išlaisvinimas citochromas c [Papadakis ir kt., 2006]. Be to, JNK didina proapoptozinių baltymų (Bax, Bim, Bid) raišką ir skatina jų kaupimąsi mitochondrijose. Pelės embrionų fibroblastai, išskirti iš JNK1^{-/-} ir JNK2^{-/-} embrionų, pasižymi sutrikusia mitochondrinio apoptozės kelio efektorinių kaspazių aktyvacija, tačiau Fas indukuotoje apoptozėje (išorinis apoptozės kelias) trūkumų nerasta. Naujausiais duomenimis, JNK gali skatinti ląstelės išgyvenimą, o tai vyksta tam tikromis sąlygomis: JNK fosforilina ir inaktyvina proapoptozinį Bcl-2 šeimos baltymą Bad. Šiuo atveju Bad inaktyvacija reikalinga IL-3 tarpininkaujama ląstelės išgyvenimui [Jin ir kt., 2005; Horbinski ir kt., 2005].

1.5.3. p38 signalo perdavimo kelias

p38 MAP kinazių šeima pirmiausia buvo identifikuota kaip lipopolisacharidų (LPS) aktyvinamos proteinkinazės [Minden ir kt., 1997]. p38 kinazę aktyvina MKK3 bei MKK6. Be to, yra duomenų, kad p38 MAPK gali fosforilinti ir aktyvinti MKK4, kurio pagrindinis taikinytis yra c-Jun N-galinė kinazė (JNK). Žinduoliuose identifikuota keturios p38 izoformos: α, β, γ, ir δ. Iš jų tik p38α ir p38β pasižymi jautrumu specifiniams p38 MAPK inhibitoriams (SB202190 ir SB203580) [Sudo ir kt., 2001]. Šios MAP kinazės svarbios transkripcijos faktorių ATF-2, CHOP, STAT1, ELK-1 reguliacijai. Jos taip pat aktyvina MAPKAP-2, -3 ir -5 kinazes, kurios, savo ruožtu, fosforilina kitus baltymus (Hsp25, Hsp27).

p38 MAP kinazių signalinį kelią gali aktyvinti tokie stresiniai faktoriai kaip osmosinis slėgis, priešuždegiminiai citokinai, UV spinduliuotė, patogenų lipopolisacharidai, šiluminis šokas, oksidacinis stresas, genotoksinės medžiagos.

Aktyvi p38 MAPK lemia diferenciacijos procesą įvairiose ląstelių rūšyse: adipocituose, mioblastuose, neuronuose [Zhang W. ir kt., 2002]. Literatūros duomenimis, 3T3-L1 ląstelių diferenciacijai į adipocitus ir PC12 ląstelių diferenciacijai į neuronus reikalinga p38α ir/arba p38β izoformos [Ono ir kt., 2000]. Be to, p38 MAPK yra svarbios imuninės sistemos ląstelių proliferacijai ir diferenciacijai, dalyvauja priešuždegiminių citokinų sintezės reguliacijoje [Ono ir kt., 2000; Roux ir kt., 2004].

Sukaupta duomenų, kad p38 MAP kinazių kelias svarbus ir apoptozės procese. Nustatyta, kad p38 aktyvina Fas-L raišką ir tokiu būdu indukuoja apoptozę. Šios MAP kinazės vaidmuo programuotos ląstelių žūties procese didele dalimi priklauso nuo ląstelių rūšies ir poveikio stiprumo. Yra duomenų, kad p38 MAPK gali apsaugoti pirminius žiurkės kardiomiocitus nuo anizomicino indukuotos apoptozės, o PC12 ląstelėse p38 aktyvacija sukelia apoptozę. Naujausiais duomenimis, p38 MAPK yra susijusi su transkripcijos faktoriaus NF- κ B aktyvinimu, indukuojant antiapoptozinio geno, koduojančio FLICE-inhibitorinį baltymą (c-FLIP) transkripciją [Grethe ir kt., 2004]. c-FLIP – tai kaspazės-8 homologas, gebantis inhibuoti pastarosios cisteino proteazės aktyvaciją. To pasėkoje slopinama apoptozė.

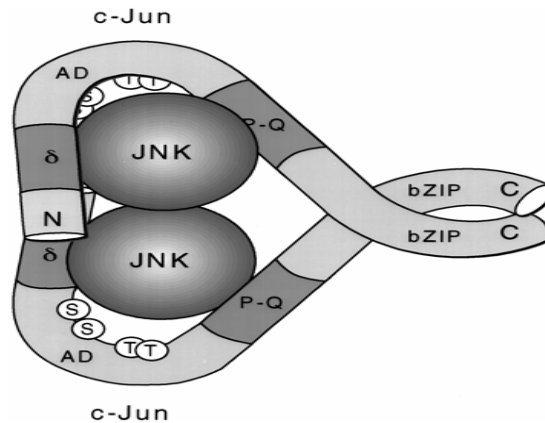
1.6. c-Jun transkripcijos faktoriaus vaidmuo signalo perdavime

Baltymas c-Jun buvo identifikuotas pagal jo homologiją v-Jun. Pastarasis atrastas paukščių sarkomos viruse 17. c-Jun turi transkripcijos aktyvacijos domenų, esančius netoli N-galo. Čia esantis delta domenas (aminorūgštys 34-60) yra svarbus transkripcijos reguliavimui. C-gale rasti DNR surišantys ir dimerizacijos domenai. Įvykus mutacijai DNR surišimo domene, prarandamas onkogeniškumas [Vogt, 2001]. v-Jun nuo ląstelinio savo homologo skiriasi delta domeno delecija, o C-gale turi pakeistas 2-3 aminorūgštis. Dėl to jis negali būti fosforilinamas, tačiau yra konstitutyviai aktyvus.

c-Jun yra transkripcijos faktoriaus AP-1, į kurio sudėtį dar įeina Fos, ATF ir Maf šeimų baltymai, komponentas [Efferl, 2003]. Fos baltymų šeimą sudaro - c-Fos, Δ FosB, Fra-1, Fra-2 baltymai; Jun šeimą - c-Jun, JunB, JunD baltymai; aktyvuojančio transkripcijos faktoriaus ATF šeimą - ATF2, ATF3/LFR baltymai. Visiems jiems būdinga "leucino užtrauktuko" struktūra. Jos dėka, šie baltymai dimerizuojasi ir rišasi su DNR. Jun/Jun ir Jun/Fos dimerai jungiasi prie forbolio 12-O-teradekanoato-13-acetato (TPA) atsako elemento (TRE), kuris turi konsensinę seką TGA κ CTCA, o Jun/ATF dimerai ir ATF homodimerai jungiasi prie cAMP atsako elemento (CRE), turinčio konsensinę seką TGACGTCA [Karin ir kt., 1997]. AP-1 transkripcijos faktoriaus nariai gali kontroliuoti genų, atsakingų už įvairius ląstelės procesus (proliferaciją, diferenciaciją, transformaciją, apoptozę), raišką [Komoda ir kt., 2002]. AP-1 komplekso vaidmuo šiuose procesuose priklauso nuo baltymų, įeinančių į jo sudėtį, kombinacijų.

Pagrindinis c-Jun aktyvatorius yra c-Jun N-galinė kinazė (JNK), kuri sąveikauja su baltymo delta domenu. Tokiu būdu fosforilinamos serino 73 ir serino 63; treonino 91 ir treonino 93 liekanos, esančios N-gale, transkripcijos aktyvacijos domene. Šio fosforilinimo rezultatas - padidėjęs transkripcinis c-Jun aktyvumas [Karin ir kt., 1997]. JNK turi sritį, kuria

sąveikauja su c-Jun. Ši sritis ir P+1 padėtyje nuo fosfoakceptorinės srities esanti prolinio liekana yra būtini veiksmingam c-Jun fosforilinimui (**9 pav.**). Manoma, kad JNK fosforilina c-Jun efektyviau nei JunD, o JunB JNK nefosforilina [Kaminska ir kt., 2000].



9 pav. JNK sąveikos su c-Jun hipotetinis modelis [May ir kt., 1998].

Nustatyta, kad p38 MAPK taip pat gali aktyvinti c-Jun. Literatūros duomenimis, p38 gali netiesiogiai reguliuoti c-Jun transkripcinį aktyvumą, aktyvindama transkripcijos faktorius, kurie jungiasi prie AP-1 srities *c-jun* promotoriuje [Karin ir kt., 1997]. Žinoma, kad p38 fosforilina ir aktyvina MEF2A ir MEF2C, kurie savo ruožtu aktyvina c-Jun per MEF atsako elementą, esantį *c-jun* promotoriuje [Gupta ir kt., 2002; Pramanik ir kt., 2003].

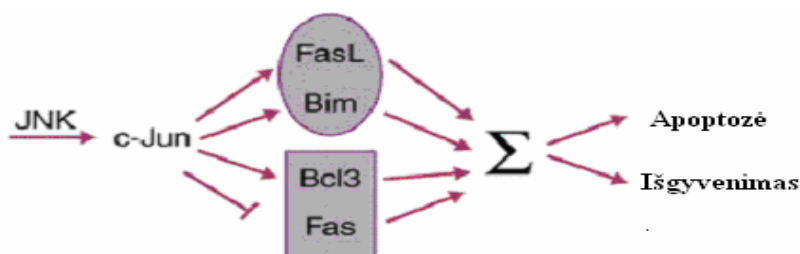
Be to, ERK MAPK gali netiesiogiai didinti c-Jun aktyvumą, fosforilindamos ir aktyvindamos transkripcijos faktorius MEF2, kuris jungiasi prie *c-jun* promotoriaus, bei TCF, kuris indukuoja c-Jun partnerį – c-Fos [Minden ir kt., 1997]. Literatūros duomenimis, Jun/Fos heterodimerai gali didinti *c-jun* transkripciją. Nustatyta, kad ERK1/ERK2 aktyvina RSK ir MSK kinazes, o pastarosios tiesiogiai fosforilina ATF1, besijungiantį prie *c-jun* promotoriaus [Gupta ir kt., 2002].

Daugelyje ląstelių *c-jun* raiška nedidelė. Ji padidėja, atsakant į įvairius išorinius ir vidinius veiksnius, t.y. augimo faktorius, citokinus, UV spinduliavimą [Karin ir kt., 1997]. Fibroblastų tyrimai parodė, kad c-Jun gali dalyvauti proliferacijos kontrolėje. Ląstelėse, kuriose nėra funkcionuojančio *c-jun* alelio, augimas vėluoja tiek *in vivo*, tiek *in vitro* [Pérez ir kt., 1999; Eferl ir kt., 2003]. Nustatyta, kad *c-jun* būtinas normaliam individų vystymuisi. Homozigotiniai *jun^{-/-}* embrionai žūva anksti dėl susilpnėjusios hepatogenezės ir išsivysčiusių įvairių širdies sutrikimų [Angel ir kt., 2002]. Literatūros duomenimis, Jun svarbus G₁ ląstelės ciklo fazėje [Wisdom ir kt., 1999]. Aktyvus c-Jun indukuoja transkripciją teigiamų ląstelės ciklo reguliatorių (ciklino D1) ir supresuoja neigiamus reguliatorius (p53) bei nuo ciklinų priklausomą kinazės inhibitorių INK4A [Shaulian ir kt., 2000; Eferl ir kt., 2003].

AP-1 kompleksas svarbus ir apoptozės procesui. Nustatyta, kad c-Jun reikalingas apoptozei, vykstančiai simpatiniuose neuronuose, nesant nervų augimo faktorių (NGF). Padidėjusi *c-jun* raiška stebima fibroblastuose, esant ceramido indukuotai apoptozei. Pastebėtas c-Jun proapoptozinis veikimas ir žmogaus endotelio ląstelėse, kur šis jo vaidmuo siejamas su transkripciniu reguliavimu bei kaspazių aktyvinimu.

Žinomas ir antiapoptozinis bei neutralus c-Jun vaidmuo. Manoma, kad c-Jun gali apsaugoti ląsteles nuo UV indukuojamos apoptozės, be to, apsaugo ląsteles nuo TNF- α sukeltos ląstelių žūtis. Pastaruoju atveju, c-Jun veikia kartu su NF- κ B [Eferl ir kt., 2000]. Literatūros duomenimis, NIH 3T3 ląstelių linijose padidėjusi c-Jun ekspresija sukelia apoptozę, tačiau BALB/c 3T3 ląstelių linijose, nors c-Jun ekspresuojamas aukštu lygiu, tačiau apoptozė neindukuojama [Vogt, 2001]. Be to, gali būti, kad AP-1 kompleksas būtinas tik tose apoptozės formose, kur reikalinga baltymų sintezė *de novo* [Karin ir kt., 1997]. Taigi, vertinant c-Jun vaidmenį, svarbu žinoti genetinį foną ir ląstelinį kontekstą.

Literatūros duomenimis, c-Jun vaidmuo ląstelės išgyvenimo ir žūtis pusiausvyros reguliacijoje dažnai priklauso nuo pro- ir antiapoptozinių genų produktų: c-Jun indukuojami proapoptoziniai genai (**10 pav.**, pavaizduota ovale) aktyvina apoptozę, o antiapoptozinių genų ekspresijos indukcija ir proapoptozinių genų ekspresijos slopinimas (**10 pav.**, pavaizduota kvadratu) veda ląstelę išgyvenimo kryptimi. Šių signalų suma didele dalimi apsprendžia ląstelės išgyvenimą arba mirtį [Eferl ir kt., 2003].



10 pav. Baltymo c-Jun vaidmuo ląstelės išgyvenimo ir žūtis pusiausvyroje [Shaulian ir Karin, 2002].

2. DARBO METODAI

2.1. Pastovių ląstelių auginimas *in vitro*

Tyrimams buvo naudotos pelės hepatomos (MH-22A) ir T leukemijos (Jurkat) linijų pastovios ląstelių kultūros.

MH-22A ląstelių linija - (Mouse Hepatoma, 22-as pirminis navikas, A-subkultūra) – ortoaminoazotoluolu indukuotos pelės hepatomos navikas. Kultūra išvesta 1948-1951m. TSRS Medicinos Mokslų Akademijos Eksperimentinės ir klinikinės onkologijos institute [Гельштейн, 1954]. Linija nėra išlaikiusi panašumo su kepenų ląstelėmis, neturi normaliam audiniui būdingų determinantų, registruotas antigeninis supaprastėjimas, kuris leidžia ląstelėms augti genetiškai svetimame tos pačios rūšies organizme. Kultūroje vyrauja epitelinės ląstelės. Citogenetiškai – tai diploidinės ląstelės, chromosomų skaičius gana stabilus – $2n=40$. Ląstelės gerai auga tiek *in vivo*, tiek *in vitro*. MH-22A kultūra *in vitro* išlaiko onkogenines savybes ir morfoliginį tapatumą su pradiniu naviku [Алексян и др., 1972]. Ląstelės pailgos ir išsitempusios, prisitvirtinusios prie substrato sudaro monosluoksnį. MH-22A ląstelių linija naudojama piktybinių ląstelių charakteristikoms bei malignacijos proceso organizme tyrimams.

Jurkat ląstelių linija – žmogaus T leukemijos ląstelės, gautos 1976m. Ląstelių linija išvesta iš 14 m. amžiaus berniuko, sergančio limfoblastine leukemija, periferinio kraujo pirmojo recidyvo metu. Citogeniškai – tai ląstelės su hipotetraploidiniu chromosomų rinkiniu, iš kurių 7,8% poliploidinio kariotipo. Ląstelės yra apvalios, suspensijoje auga pavieniui arba grupėmis. Linija naudojama imunologiniuose tyrimuose bei tiriant priešvėžinių vaistų ir radioaktyvios spinduliuotės poveikio mechanizmus.

Monosluoksinės MH-22A linijos ląstelės auginamos modifikuotoje Iglo terpėje (MEM; Sigma) praturtintoje 10% fetalinio veršelio serumo (FVS) bei antibiotikais – penicilinu (100 IU/ml) ir streptomicino sulfatu (100 µg/ml), stikliniuose ir/arba plastikiniuose flakonėliuose, 37⁰C termostate, esant 5% CO₂. Ląstelių monosluoksnis apžiūrimas ir vertinamas invertuotu mikroskopu. Susiformavus monosluoksniui, ląstelės persėjamos: nupilama sena auginimo terpė, monosluoksnis praplaunamas terpe be serumo arba fosfatiniu buferiu (FB) ir disperguojamas EDTA:tripsino (santykiu 9:1) mišiniu. 0,5 ml šio mišinio paliekama flakonėlyje, inkubuojama 37⁰C termostate 2-5 min. Kai ląstelių monosluoksnis disocijuoja, suspensija praskiedžiama šviežia auginimo terpe su FVS, pipetuojama ir išsėjama į naujus flakonėlius. Ląstelės persėjamos 2 kartus per savaitę.

Suspensinės Jurkat ląstelės auginamos RPMI 1640 terpėje (Sigma) su 10% FVS bei antibiotikais (penicilino 100 IU/ml, ir streptomicino sulfato 100 µg/ml) 37⁰C termostate, esant 5% CO₂. Ląstelės persėjamos kas 2 - 3 dienas.

2.2. Augimo intensyvumo nustatymas

Ląstelių augimo intensyvumas po poveikio tiriamomis medžiagomis buvo vertinamas ląstelės dažant tripano mėliu ir skaičiuojant Goriajevo kameroje šviesiniu mikroskopu. Metodas pagrįstas dažo patekimu į negyvas ląsteles - negyvos ląstelės dažosi mėlyna spalva.

Tuo tikslu nupilama auginimo terpė, ląstelių monosluoksnis disperguojamas EDTA:tripsino mišiniu (suspensinėms ląstelėms ši stadija praleidžiama), praskiedžiama auginimo terpe su 10% FVS, centrifuguojama 10 min. 1500 aps./min., supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos šviežioje auginimo terpėje su FVS ir suskaičiuojamos. Paruošiama ląstelių suspensija 3x10⁵ ląstelių/ml. Į 24 duobučių polistirolines plokšteles išpilstoma suspensija po 1 ml. Į suspensinių ląstelių kultūrą tiriamos medžiagos pridedamos išsėjimo dieną po 2-4 val. adaptacinio periodo. Monosluoksninės kultūros ląstelės auginamos 37⁰C 5% CO₂ termostate per naktį. Abiem atvejais tiriamomis medžiagomis veikiamos ląstelės turi būti intensyvaus augimo (logaritminėje) fazėje.

Ląstelių augimo intensyvumas vertinamas po 24 ir 48 tiriamų medžiagų poveikio valandų; ląstelių suspensija maišoma lygiomis dalimis su 0.4% tripano mėlio tirpalu, paruoštu fosfatiniame buferyje (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl); ląstelės skaičiuojamos šviesiniu mikroskopu Goriajevo kameroje.

2.3. Ląstelių gyvybingumo nustatymas

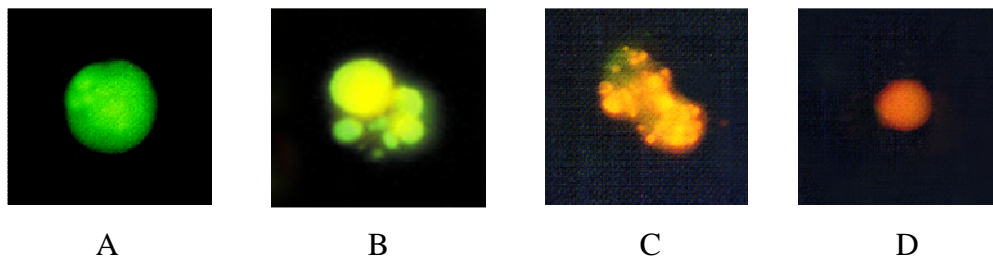
Ląstelių gyvybingumas buvo tiriamas liuminescentinės mikroskopijos metodo pagalba, naudojant fluorescuojantį, su DNR besijungiantį akridino oranžinio (AO) – 100 µg/ml ir etidžio bromido (EB) – 100 µg/ml dažų mišinį [Mercille ir kt., 1994]. Tirpalai ruošti fosfatiniame buferyje.

Tuo tikslu surenkama užaugusių ląstelių terpė bei EDTA: tripsino mišiniu disperguoto monosluoksnio ląstelės ir centrifuguojama 5-7 min. 1500 aps./min. greičiu. Supernatantas pašalinamas, o ląstelės suspenduojamos nedideliame tūryje terpės. 100 µl gautos suspensijos maišoma su 4 µl dažų mišinio. 10 µl tokio paruošto mišinio dedama ant objektyvio stiklelio, uždengiama dengiamuoju stikleliu ir liuminescentiniu mikroskopu vertinamas gyvybingumas. Kiekviename pavyzdyje skaičiuojama 2 kartus po 100 ląstelių.

AO įjungia gyvos ir negyvos ląstelės. Šis dažas interkaluoja į dvigrandę DNR ir branduolį nudažo žaliai, o taip pat AO jungiasi su RNR ar viengrande DNR ir dažo rausvai oranžine spalva, todėl gyvoje ląstelėje matomas žalias branduolys ir rausva citoplazma. EB įjungia tik negyvos ląstelės, nes gyvų ląstelių membranos nepraleidžia šio dažo. EB įsijungia į DNR, nudažydama branduolį oranžine spalva, o su RNR jungiasi silpnai ir dažo silpnai rausva spalva. Tai gi, negyvos ląstelės turi ryškiai oranžinį chromatiną, o citoplazmos likučiai yra tamsiai rausvi.

Šiuo būdu nudažytų ląstelių masėje galima išskirti penkių rūšių ląsteles:

- Gyvos (G - ryškiai žalias branduolys);
- Gyvos apoptozinės (GA – kondensuotas ar fragmentuotas branduolys, spindi žalsvai);
- Negyvos apoptozinės (NA - branduolys fragmentuotas, oranžinės spalvos);
- Nekrozinės (N - branduolys vientisas, nusidažęs oranžine spalva; citoplazmos likučiai tamsiai rusvi);
- Šešėlinės – ląstelės be chromatino (BCH - tai ląstelės netekusios DNR, dažosi šviesiai oranžine spalva citoplazmos likučiai) (**11 pav.**).



11 pav. Diferencijuotas ląstelių dažymas AO/EB dažų mišiniu: A – gyvos, B – gyvos apoptozinės, C – negyvos apoptozinės, D – nekrozinės.

2.4. Priešprasminės *c-jun* sekos įvedimas

1 diena: Išsėjamos taikininės MH-22A ir virusą produkuojančios PA 317 ląstelės (3×10^5 ląstelių/ml). Šių dviejų ląstelių linijų auginimui naudojama DME (Dalbeko modifikuota Iglo) terpė, su 10% FVS ir antibiotikais.

2 diena: PA 317 ląstelių terpė pakeičiama į DMEM terpę su 3 % FVS ir ir inkubuojama 37°C 5% CO_2 termostate. Po 8-12 val. terpė surenkama, pridedama 4 $\mu\text{g/ml}$ polibreno ir filtruojama per 0,45 μm sterilinantį filtrą.

2 ml paruoštos terpės pridedama į taikininių MH-22A ląstelių flakoną (prieš tai nupilama auginimo terpė), inkubuojama 1 val. 1-2 kartus jį pajudinant, kad ląstelės neišdžiūtų. Po

inkubacijos pridedama 2-3 ml DME terpės su 10% FVS ir 4 µg/ml polibreno. Inkubuojama 24 val.

3 diena: Infekuotų taikininių ląstelių flakonėlyje pakeičiama terpė. Naudojama DME terpė su 10% FVS ir 100 µg/ml geniticino. Turėtų augti tik infekuotos, geniticinui atsparios kolonijos. Genitricinas toksiškas augančioms parentalinėms ląstelėms.

2.5. Ląstelių lizavimas

Paruošiama ląstelių suspensija, kurios tankis 3×10^5 ląstelių/ml. Ši suspensija išpilstoma į 6 (arba 12) duobučių polistirolines plokšteles po 3 (arba 2) ml. Kitą dieną pakeičiama auginimo terpė (monosluoksninėms ląstelėms), tam tikrais momentais pridedamas reikiamas kiekis tiriamų medžiagų.

Paruošiamas lizės buferis: 10 mM TrisHCl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5 mM NaF; 0,1% BSA; 1% Triton X-100. Prieš buferio naudojimą pridedama 20 µg/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄. Tirpalo pH turi būti 7,2. 1 mln. monosluoksnių ir 6 mln. suspensinių ląstelių imamas 1 ml lizės buferio.

Ant ląstelių monosluoksnio arba nucentrifuguotų suspensinių ląstelių nuosėdų (centrifuguojama 10 min. 1500 aps./min. greičiu) užpilamas reikiamas kiekis lizės buferio. Laikoma lede apie 20 min. Tuomet turinys perkeliamas į atšaldytus ependorfinius mėgintuvėlius ir centrifuguojama 0 – 4°C 20 000 g 15 minučių. Supernatantas lygiomis dalimis sumaišomas su pavyzdžio buferiu. Baltymai denatūruojami inkubuojant 5 minutes verdančiame vandenyje.

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

2.6. Baltymo kiekio nustatymas Bradford metodu

Metodas pagrįstas specifine baltymo sąveika su dažu Kumasi briliantinio mėliu ir susidariusios kompleksio 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 μ l tiriamojo baltymo tirpalo, pripilama H_2O iki 1 ml ir atliekamos visos anksčiau parašytos operacijos. Gautieji rezultatai lyginami su kalibracine tiese.

2.7. 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 91g Tris bazinio, 2 g NDS, 300 ml bidistiliuoto vandens. 1N HCl nustatoma tirpalo pH 8,8 ir pripilama vandens iki 500 ml, filtruojama per 0,45 μ m porų dydžio filtrą. Laikoma 4⁰C temperatūroje.

3. 4xTrisHCl/NDS tirpalas:

- 0,5 M TrisHCl, pH 6,8;
- 0,4% NDS.

Į 80 ml bidistiliuoto 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 4⁰C 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% $(NH_4)_2S_2O_8$ (AP) – 1 ml.

6. Tetrametiletildiaminas (TEMED).

10% skiriamojo gelio 10 ml gamybai imame: Akril/Bis – 3,3 ml; 4x TrisHCl/NDS pH 8,8 – 2,5 ml; H_2O – 4,2 ml; AP – 100 μ l; TEMED – 15,6 μ l. Viskas gerai išmaišoma, supilama į aparatą ir polimerinama poliakrilamido gelio paruošimo gardelėje. Kad poliakrilamido gelio paviršius būtų lygus, prieš polimerizaciją užsluoksniuojama izopropanoliu, kuris po polimerizacijos nupilamas ir plaunamas distiliuotu vandeniu.

4% koncentruojamojo gelio 5,08 ml gamybai imame: Akril/Bis – 0,65 ml; 4x TrisHCl/NDS pH – 1,27 ml; H_2O – 3,1 ml; AP – 50 μ l; TEMED – 10 μ l. Gerai išmaišoma ir užpilama ant skiriamojo 10% poliakrilamido gelio paviršiaus. Įdedamos “šukos”. Geliui susipolimerinus “šukos” atsargiai išimamos.

Į elektroforezės aparatą pripilame elektrodinio buferio. Į “kišenes” įnešama po 30 µl paruoštų žinomos baltymo koncentracijos ląstelių lizatų. Įjungiamo elektros srovė. Srovės stiprumas padidinamas, kai bromfenolio dažas įeina į skiriamąjį gelį. Kai bromfenolio mėlio dažas išeina iš gelio, srovė išjungiamo.

2.8. Imunoblotingas

Baltymai iš poliakrilamido gelio pernešami ant nitroceliuliozės membranos. Tuo tikslu gelis dedamas ant nitroceliuliozės membranos, iš abiejų pusių uždedama po 4 sluoksnius vatmano ir suspaudžiama. Dedama į pernešimo aparatą, pilamas pernešimo buferis (500 ml buferio paruošimui 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 3 valandas.

Po pernešimo membranos merkiamos į “bloto” tirpalą (1% neriebaus pieno milteliai; 0,05% Tween 20; 0,01% NaN₃) ir laikoma 1 val. Išėmus iš šio tirpalo plaunama tris kartus po 5 min. plovimo tirpalu (10 mM TrisHCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Tada paveikiama pirminiais antikūnais ir inkubuojama 4⁰C temperatūroje per naktį. Po to, nusiurbus pirminius antikūnus, plaunama plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Vėliau užpilami antriniai antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze, ir inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje. Po inkubacijos plaunama tris kartus po 5 min. plovimo tirpalu. Imunoblotas išryškkinamas ECL (sustiprinta chemoluminescensija) metodu.

Imunoblotingas atliktas pagal *Amersham pharmacia Biotech* protokolą.

2.9. Naudotos medžiagos

Citochalazinas E (Sigma-Aldrich), ištirpintas dimetilsulfoksido (DMSO). Gauta koncentracija 2 mg/ml. Iki galutinės, eksperimentuose naudotos, koncentracijos skiesta auginimo terpe.

Deoksinivalenolis (Sigma-Aldrich), ištirpintas etanolyje. Gauta koncentracija 2 mg/ml. Iki galutinės, eksperimentuose naudotos, koncentracijos skiesta auginimo terpe.

JNK inhibitorius – SP600125 (A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA), ištirpintas dimetilsulfoksido (DMSO). Gauta koncentracija 20 mM. Iki galutinės, eksperimentuose naudotos, koncentracijos skiesta auginimo terpe.

p38 inhibitorius – SB203580 (Sigma-Aldrich), ištirpintas dimetilsulfoksido (DMSO). Gauta koncentracija 20 mM. Iki galutinės, eksperimentuose naudotos, koncentracijos skiesta auginimo terpe.

2.10. Statistinė duomenų analizė

Statistiniai vidurkiai ir pasikliauties intervalai buvo apskaičiuoti naudojant kompiuterinę programą *Mikrosoft Excel*.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šio darbo tikslas buvo įvertinti citochalazino E (CE) ir deoksinivalenolio (DON) veikimo mechanizmus, panaudojant skirtingos kilmės bei genetiškai modifikuotas ląsteles. Žinoma, kad gyvame organizme pagrindiniai mikotoksinų taikiniai yra plaučiai, kepenys, inkstai. Savo darbe modeline sistema pasirinkome 2 pastovias ląstelių linijas: kepenų kilmės pelės hepatomos MH-22A bei kraujo kilmės pre-T limfocitų Jurkat linijų ląsteles. Literatūros duomenimis, mikotoksinų toksiškumas, skirtingais mechanizmais pasireiškiantis ląsteliniame lygmenyje, yra susijęs su jų chemine struktūra [Duxbury, 2004]. Citochalazino E veikimo mechanizmas susijęs su epoksido dariniu, kuris, manoma, yra svarbus jo toksiškumui. Gautus duomenis lyginome su mikotoksino - deoksinivalenolio poveikiu, kurio veikimas literatūroje žymiai plačiau išnagrinėtas, ir kurio toksiškumas taip pat yra siejamas su epoksido dariniu [Eriksen ir kt., 2004]. Naujaisiais duomenimis, junginiai, turintys savo struktūroje epoksido grupes, gali pasižymėti priešvėžiniu aktyvumu modelinėse sistemose *in vitro* [Xie ir kt., 2005].

3.1. Augimo intensyvumo ir gyvybingumo tyrimas skirtingos kilmės ląstelių populiacijose

Literatūros duomenimis, jau pikomolinės citochalazino E koncentracijos priklausomai nuo ląstelių tipo, gali įtakoti jų proliferaciją *in vitro*. Esant didesnėms koncentracijoms, yra stebimas ląstelių augimo ir dauginimosi slopinimas, susijęs su jų žūtimi [Udagawa ir kt., 2000]. Todėl pirmojoje darbo dalyje tyrėme citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikį MH-22A bei Jurkat ląstelių augimo intensyvumui ir gyvybingumui. Tyrimams buvo pasirinktos 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml CE ir DON koncentracijos. Tiriamos medžiagos į suspensinių ląstelių kultūrą buvo pridamos tuoj po išsėjimo, o į monosluoksnių ląstelių populiaciją – praėjus 24 val. nuo išsėjimo, ląstelėms esant aktyvios proliferacijos logaritminėje (log) fazėje. Visos ląstelės augintos terpėje, praturtintoje 10% FVS. Užaugusių ląstelių kiekį ir gyvybingumą vertinome po 24 bei 48 mikotoksinų poveikio valandų. Ląstelių augimo intensyvumas po poveikio tiriamais mikotoksinais vertintas ląsteles dažant tripano mėliu ir skaičiuojant Gorajjevo kameroje šviesiniu mikroskopu.

Ląstelių gyvybingumas buvo tiriamas liuminescencinės mikroskopijos metodo pagalba. Buvo naudotas fluorescuojantis, su DNR besijungiantis etidžio bromido ir akridino oranžinio dažų mišinys. Pagal šių dažų įsijungimą, ląsteles galima suskirstyti į penkias grupes: G –

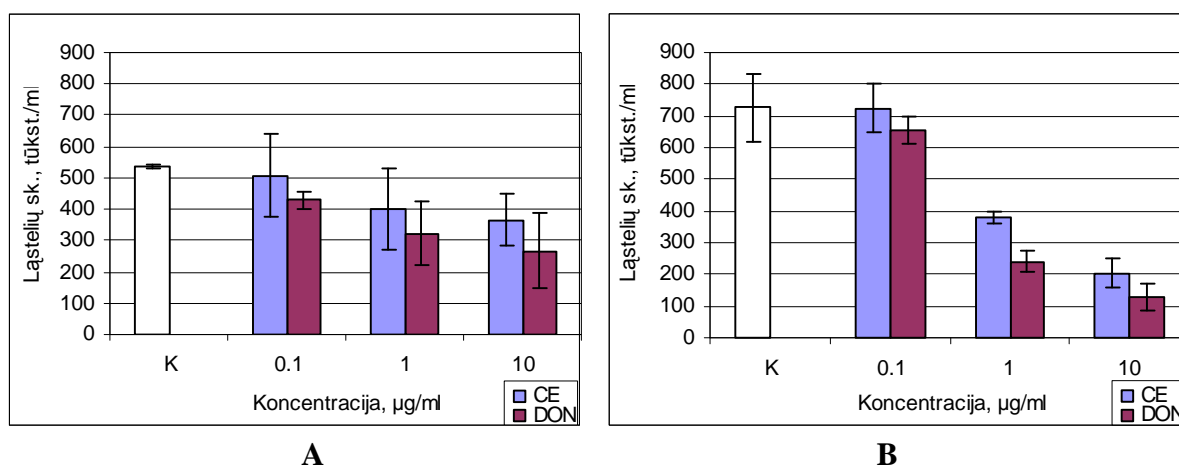
gyvos; GA – gyvos apoptotinės; NA – negyvos apoptotinės; N – nekrotinės; BCH – ląstelės be chromatino [Mercille ir kt., 1994].

3.1.1. Augimo intensyvumo ir gyvybingumo tyrimas Jurkat ląstelių populiacijoje

Pradžioje vertinome citochalazino E ir deoksinivalenolio (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ir 10 $\mu\text{g/ml}$) poveikį kraujo pre-T limfocitų (Jurkat) ląstelių proliferacijai ir gyvybingumui. Ląstelių augimo intensyvumas buvo stebėtas po 24 ir 48 tiriamųjų medžiagų poveikio valandų. Proliferaciją slopinantis tiriamų mikotoksinų veikimas jau išryškėjo po 24 poveikio valandų (**12 pav.**). Poveikio laikui ilgėjant, ląstelių augimą stabdantis efektas stiprėjo. Nustatėme, kad šių mikotoksinų poveikis priklauso nuo dozės.

Stipriausiu antiproliferaciniu poveikiu pasižymėjo DON. Ypač efektyviai ši medžiaga veikė esant didžiausiai tirtai - 10 $\mu\text{g/ml}$ - koncentracijai. Šiuo atveju, po 24 DON poveikio valandų ląstelių skaičius sumažėjo 2 kartus, o po 48 poveikio valandų - net 7 kartus, lyginant su kontrolinėmis ląstelių populiacijomis, t. y. atitinkamai nuo 550 iki 250 tūkst. ląstelių/ml (po 24 val.) ir nuo 700 iki 250 tūkst. ląstelių/ml (po 48 val.).

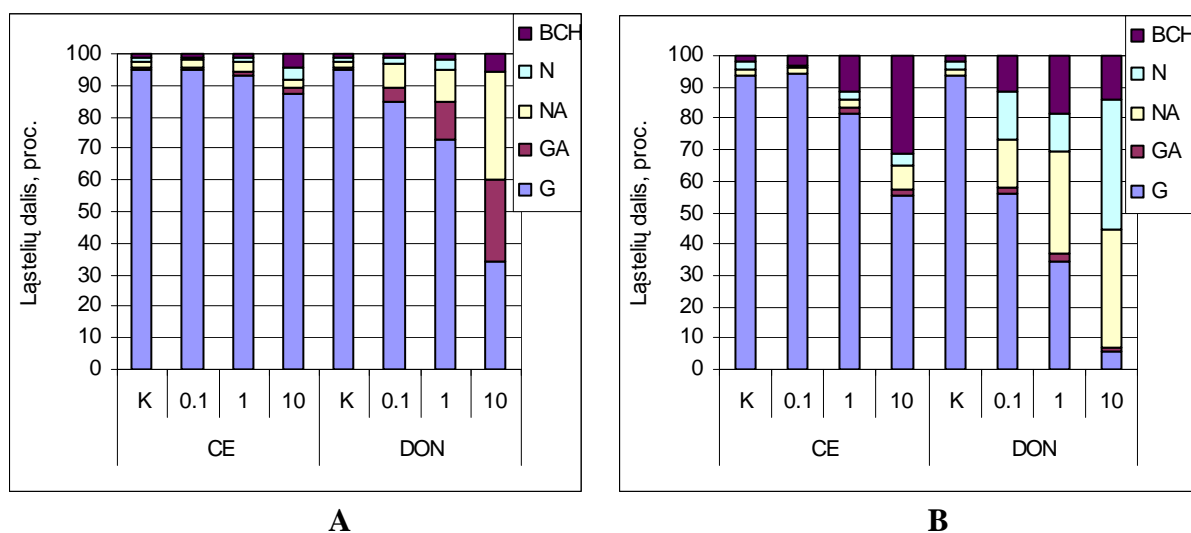
Kiek silpniau Jurkat ląstelių augimą įtakojo CE. Tačiau poveikio laikui ilgėjant ir didėjant CE koncentracijai, antiproliferacinis veikimas stiprėjo. Jau po 48 CE (10 $\mu\text{g/ml}$) poveikio valandų, gyvų liko tik 200 tūkst. ląstelių/ml, t. y. maždaug 3,5 karto mažiau ląstelių nei kontrolinėje populiacijoje.



12 pav. Jurkat ląstelių augimo intensyvumo kitimas po 24 (A) ir 48 (B) tiriamųjų mikotoksinų poveikio valandų.

Tolesnėje darbo dalyje tyrėme Jurkat ląstelių gyvybingumą po CE ir DON poveikių. Gauti duomenys parodė, kad abi tirtos medžiagos indukavo pre-T limfocitų žūtį ir šis efektas stiprėjo didėjant CE ir DON koncentracijoms bei ilgėjant poveikio laikui. **13 paveiksle**

matome, kad DON ne tik stabdė tiriamų ląstelių dauginimąsi, bet ir stipriai įtakojo jų gyvybingumą: po 24 10 µg/ml DON poveikio valandų gyvų ląstelių populiacijoje buvo rasta apie 30%, o po 48 poveikio val. – mažiau nei 10%. Tuo tarpu CE citotoksiškumas Jurkat ląstelėms buvo daug mažesnis: po 24 poveikio valandų, net esant didžiausiai CE koncentracijai, gyvų ląstelių dalis populiacijoje sudarė kiek mažiau nei 90%, o po 48 poveikio valandų sumažėjo iki 55%. Palyginę apoptozinių ląstelių dalį Jurkat ląstelių populiacijoje po CE ir DON poveikių, matome, kad 24 DON poveikio valandų pasėkoje palaipsniui didinant koncentraciją, apoptozinių ląstelių dalis didėja ir, esant didžiausiai - 10 µg/ml koncentracijai, pasiekia net 60%; po 48 poveikio valandų – apoptozinių ląstelių dalis sumažėja dvigubai ir atsiranda didelė dalis (apie 40%) nekrozinių ląstelių. Tuo tarpu po CE poveikio, nepriklausomai nuo veikimo trukmės, buvo rasta ir apoptozinių, ir nekrozinių ląstelių. Nemažą dalį, šiuo atveju, sudarė ir ląstelės be chromatino (nuo 5 iki 10%, atitinkamai po 24 ir 48 poveikio valandų).



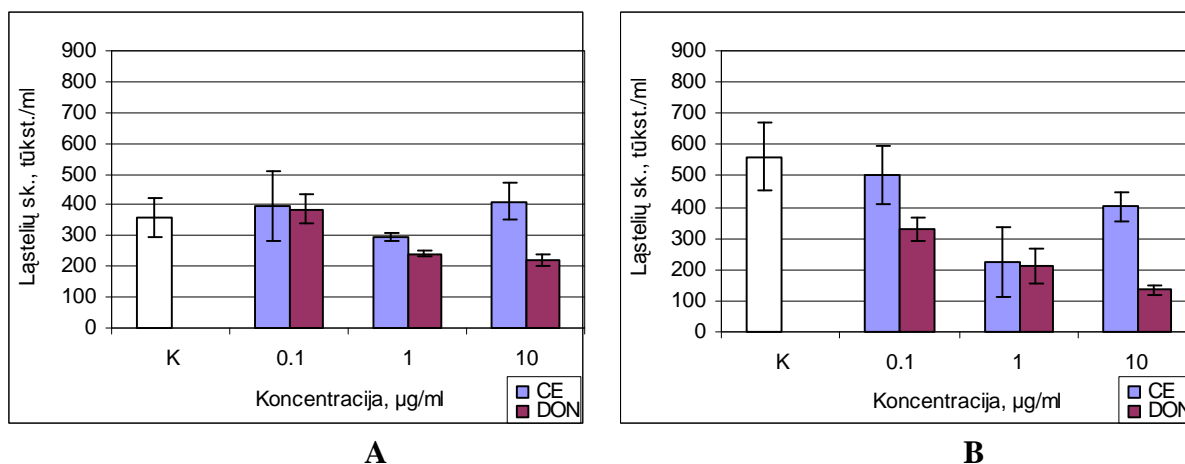
13 pav. Jurkat ląstelių gyvybingumo palyginimas po 24 (A) ir 48 (B) tiriamų mikotoksinių poveikio valandų.

3.1.2. Augimo intensyvumo ir gyvybingumo tyrimas MH-22A ląstelių populiacijoje

Tokie patys tyrimai buvo atlikti kepenų kilmės pelės hepatomos (MH-22A) linijos ląsteles paveikus citochalazinu E ir deoksinivalenoliu. Tyrimuose naudojome tokias mikotoksinių koncentracijas: 0.1 µg/ml, 1 µg/ml ir 10 µg/ml. Skirtingai nei kraujo kilmės Jurkat ląstelės, kurios auga suspensijoje, šios linijos ląstelės turi prisitvirtinti prie paviršiaus ir augdamos formuoja monosluoksnį. MH-22A ląstelės buvo paveikiamos tiriamomis medžiagomis praėjus parai nuo jų išsėjimo, t.y. ląstelėms esant aktyvios proliferacijos fazėje.

Mūsų gauti duomenys rodo, DON priklausomai nuo dozės bei poveikio laiko stabdė MH-22A ląstelių augimą (**14 pav.**). Tik 0.1 $\mu\text{g/ml}$ DON koncentracija po 24 poveikio valandų neįtakojė šių ląstelių augimo intensyvumo ir netgi nežymiai stimuliavo. Tačiau jau po 48 poveikio val. tokia pačia DON doze paveiktoje populiacijoje rasta beveik du kartus mažiau ląstelių nei kontrolinėje populiacijoje.

Įdomesni duomenys buvo gauti po CE poveikio. Šiuo atveju ryškiausiai pelės hepatomos ląstelių augimo intensyvumą įtakojė 1 $\mu\text{g/ml}$ CE: po 24 poveikio valandų ląstelių skaičius sumažėjo 50 tūkst. ląstelių/ml, po 48 poveikio val. – net daugiau nei 300 tūkst. ląstelių/ml t.y. 2,5 karto lyginant su kontroline ląstelių populiacija. Tuo tarpu 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ir 10 $\mu\text{g/ml}$ CE koncentracijos po 24 poveikio valandų ne tik neslopino MH-22A ląstelių augimo, bet ir nežymiai skatino. Po 48 poveikio valandų gauti rezultatai rodo antiproliferacinį šių CE koncentracijų poveikį.

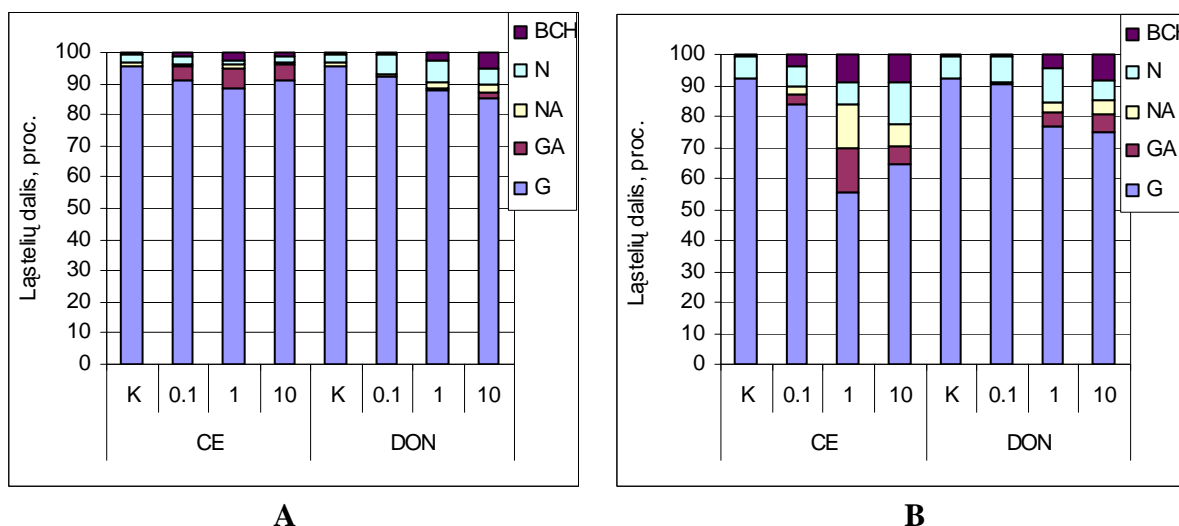


14 pav. MH-22A ląstelių augimo intensyvumo kitimas po 24 (A) ir 48 (B) tiriamų mikotoksinų poveikio valandų.

Tirdami pelės hepatomos ląstelių gyvybingumą, nustatėme, kad šios ląstelės yra gana atsparios trumpalaikiam - 24 val. - citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikiui (**15 pav.**). Šiuo atveju, tiek po CE, tiek po DON poveikio gyvų ląstelių rasta apie 90%. Poveikio laikui ilgėjant abu tirti mikotoksinai stipriau įtakojė MH-22A ląstelių gyvybingumą. Priešingai nei augimo intensyvumo tyrimo metu, kuomet ryškesniu augimą slopinančiu veikimu pasižymėjo DON, šiuo atveju stipresniu poveikiu pasižymėjo CE. Po 48 CE poveikio valandų gyvos ląstelės sudarė: 85%, 55% ir 65% atitinkamai paveikus 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ ir 10 $\mu\text{g/ml}$ CE koncentracijomis. Daugiausia apoptotinių ląstelių rasta 1 $\mu\text{g/ml}$ CE paveiktoje ląstelių populiacijoje. Poveikio laikui ilgėjant šis CE poveikis stiprėjo: apoptozinių ląstelių kiekis padidėjo nuo 6% (po 24 poveikio val.) iki 28% (po 48 poveikio val.). Taigi, 1 $\mu\text{g/ml}$ CE

koncentracija pasižymėjo stipriausiu augimą slopinančiu bei programuotą ląstelių žūtį indukuojančiu poveikiu.

DON silpniau įtakojo tirtų ląstelių gyvybingumą. Net po ilgesnio 48 valandų poveikio didžiausiomis tirtomis DON koncentracijomis (1 $\mu\text{g/ml}$ ir 10 $\mu\text{g/ml}$) paveiktose populiacijose gyvų ląstelių rasta 75%. Taigi, poveikio laikui ilgėjant bei didėjant koncentracijai, šio mikotoksino efektas mažai sustiprėjo. Priešingas poveikis buvo stebėtas kraujo kilmės Jurkat ląstelių populiacijoje, kai po 48 poveikio valandų gyvų ląstelių dalis buvo vos 10%.



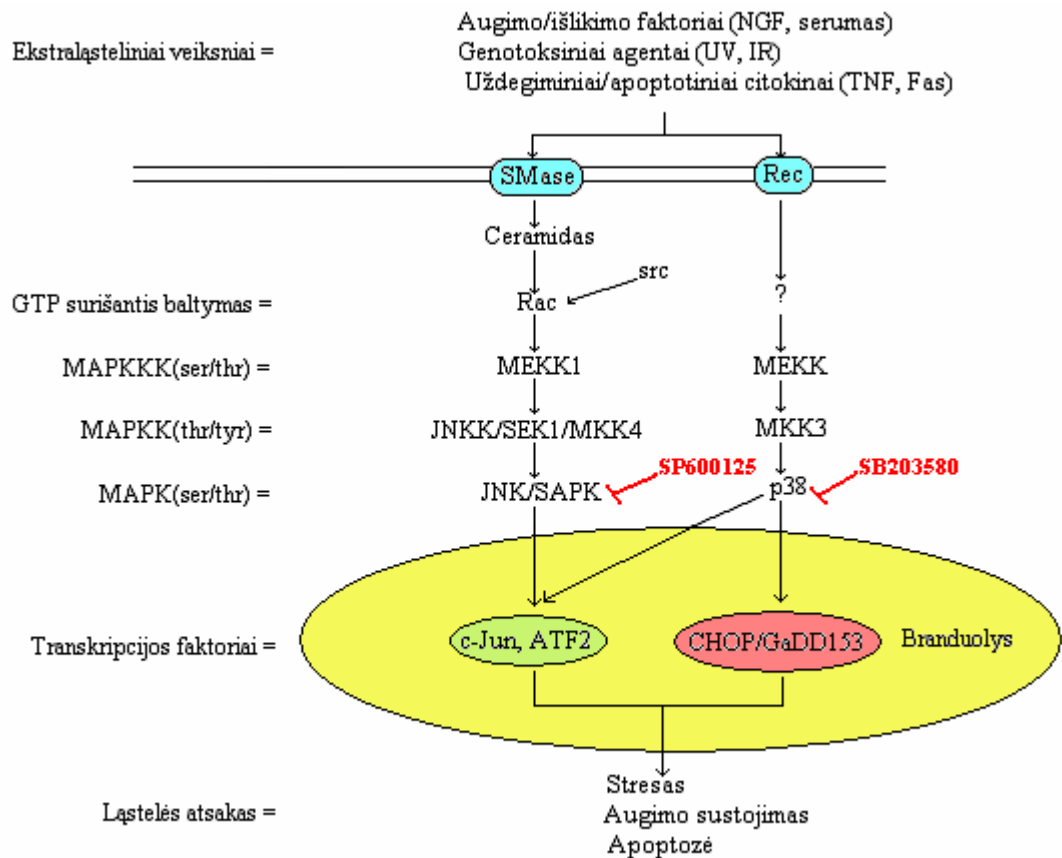
15 pav. MH-22A ląstelių gyvybingumo palyginimas po 24 (A) ir 48 (B) tiriamų mikotoksinų poveikio valandų.

Apibendrinus, tirtų mikotoksinų poveikio kraujo kilmės Jurkat ir kepenų kilmės MH-22A ląstelių augimo intensyvumui bei gyvybingumui rezultatus, galima teigti, kad tiek CE, tiek DON pasižymėjo citostatiniu veikimu. Efektyviausiai abiejų linijų ląstelių augimą slopino DON, o Jurkat ląstelių kultūroje ir CE po ilgesnio poveikio laiko. Šis CE bei DON veikimas stiprėjo didinant mikotoksinų koncentracijas bei ilginant poveikio laiką. Literatūros duomenimis, tiek CE, tiek DON citostatinis veikimas pasireiškia ląstelės ciklo sustabdymu G_0/G_1 fazėje [Rubstova ir kt., 1998; Fornelli ir kt., 2004].

3.2. Citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio mitogenų aktyvinamų proteinkinazių JNK ir p38 aktyvumui tyrimas

Mitogenų aktyvinamų proteinkinazių (MAPK) kaskada yra viena iš svarbiausių ir geriausiai ištirtų signalinių kelių, leidžiančių ląstelei tinkamai reaguoti į aplinkos pokyčius. Šis signalinis kelias priklausomai nuo ląstelių tipo, medžiagų koncentracijos, poveikio laiko gali lemti ląstelių žūtį ar išgyvenimą [Finley ir kt., 2003]. Dvi MAPK kaskados kinazės –

JNK ir p38 –dar yra vadinamos streso aktyvinamomis kinazėmis (SAPK) (16 pav.). Yra žinoma, kad laikina šių proteinkinazių indukcija lemia ląstelių išgyvenimą, o pastovi - apoptozę [Robinson ir kt., 1997; Huh ir kt., 2004]. Tačiau yra duomenų, kad skirtingose ląstelių linijose, JNK ir p38 MAP kinazės gali pasižymėti skirtingomis funkcijomis. Nurodoma, kad mažos DON koncentracijos aktyvina JNK ir p38, to pasėkoje yra slopinama baltymų sintezė bei indukuojama apoptozė [Pestka ir kt., 2004].



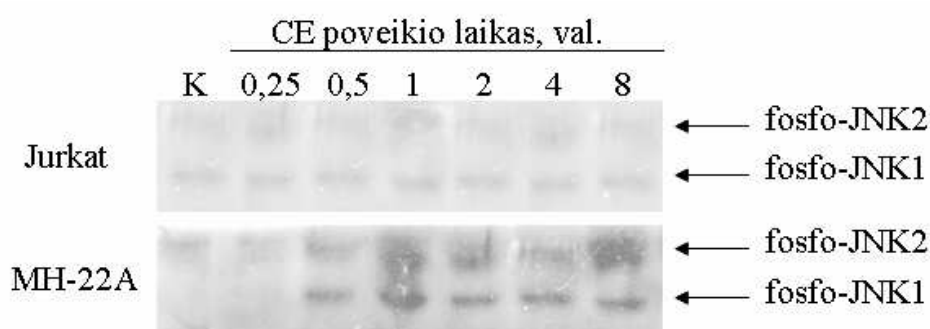
16 pav. Streso aktyvinamų proteinkinazių – JNK ir p38 – signaliniai keliai [Liebermann ir kt., 1998].

3.2.1. Citrochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio c-Jun N-galinės kinazės (JNK) aktyvumui tyrimas

Šioje darbo dalyje tyrėme CE ir DON poveikį JNK aktyvumui. Tuo tikslu Jurkat ir MH-22A linijų ląstelės buvo veikiamos vienoda - 1 µg/ml - CE ir DON koncentracija. Ši CE koncentracija pasižymėjo ryškiausiu antiproliferaciniu veikimu Jurkat ir MH-22A ląstelių populiacijose. Be to, pastarojoje ląstelių linijoje 1 µg/ml CE gana efektyviai indukavo programuotą ląstelių žūtį. Baltymo raiška buvo tiriama imunoblotingo pagalba po 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ir 8 poveikio valandų. Vertinome JNK aktyvaciją, t.y. analizavome fosforilintą JNK baltymo lygį. Yra duomenų, kad DON indukuoja greitą, tačiau trumpalaikę (0.25 – 1 val.)

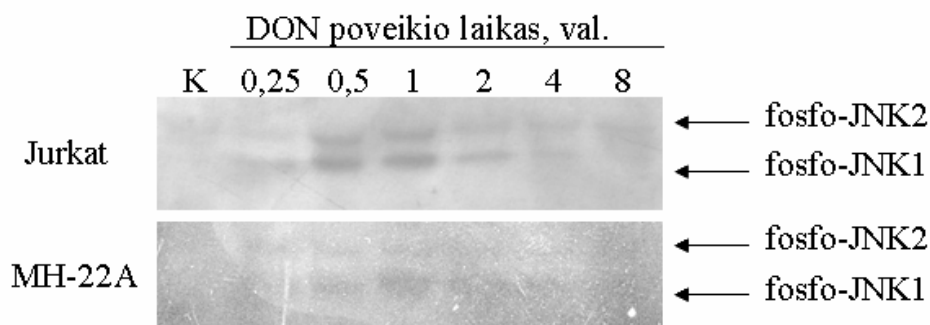
JNK1/2 aktyvaciją [Moon ir kt., 2002]. Kitais duomenimis JNK aktyvacija DON poveikio pasėkoje gali tęstis ilgiau - iki 4 valandų. Vėliau stebimas aktyvacijos sumažėjimas [Pestka ir kt., 2004].

Savo darbe nustatėme, kad CE labai nežymiai įtakojo JNK aktyvaciją kraujo kilmės T-leukemijos ląstelėse. Kiek didesnis c-Jun N-galinės kinazės fosforilinimas registruotas po 1 CE poveikio valandos, kuris jau po 2 valandų sumažėja ir pasiekia kontrolinių ląstelių fosfo-JNK1/2 lygį. Įdomesni rezultatai buvo gauti kepenų kilmės MH-22A ląstelėse. Šiuo atveju po 0.5 valandos CE indukavo ilgalaikę JNK aktyvaciją, kuri nesumažėjo net po 8 poveikio valandų (**17 pav.**).



17 pav. Fosfo-JNK lygis CE paveiktose Jurkat ir MH-22A ląstelėse.

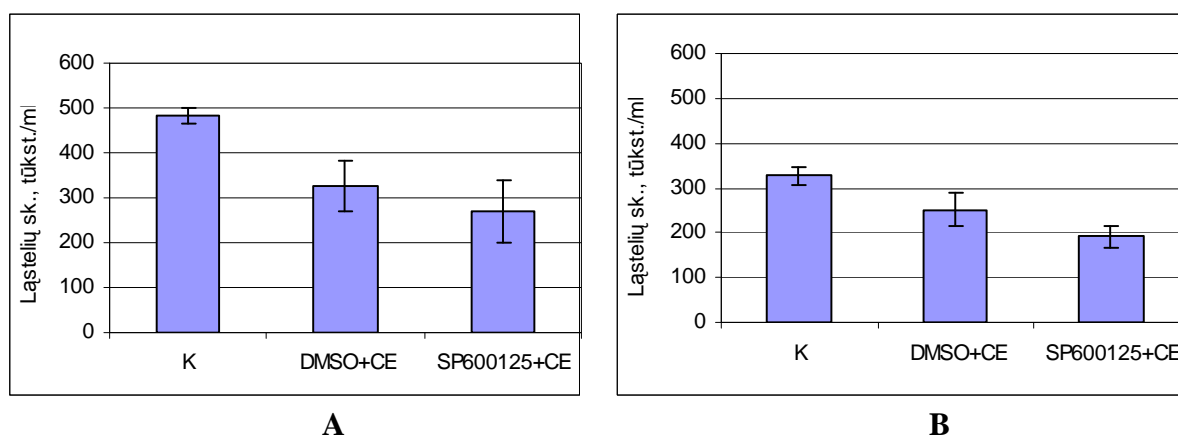
Tokie patys tyrimai buvo atlikti Jurkat ir MH-22A ląstelių populiacijas paveikus 1 $\mu\text{g/ml}$ DON. Nustatėme, kad kraujo ir kepenų kilmės ląstelėse DON jau po 0.25 poveikio valandos fosforilina ir aktyvina JNK. Tačiau Jurkat ląstelėse tai yra trumpalaikė aktyvacija, trunkanti iki 2 šio mikotoksino poveikio valandos. Vėliau fosfo-JNK1/2 lygis ryškiai sumažėja. Tuo tarpu MH-22A ląstelėse DON indukuoja ilgalaikę JNK aktyvaciją (**18 pav.**).



18 pav. Fosfo-JNK lygis DON paveiktose Jurkat ir MH-22A ląstelėse.

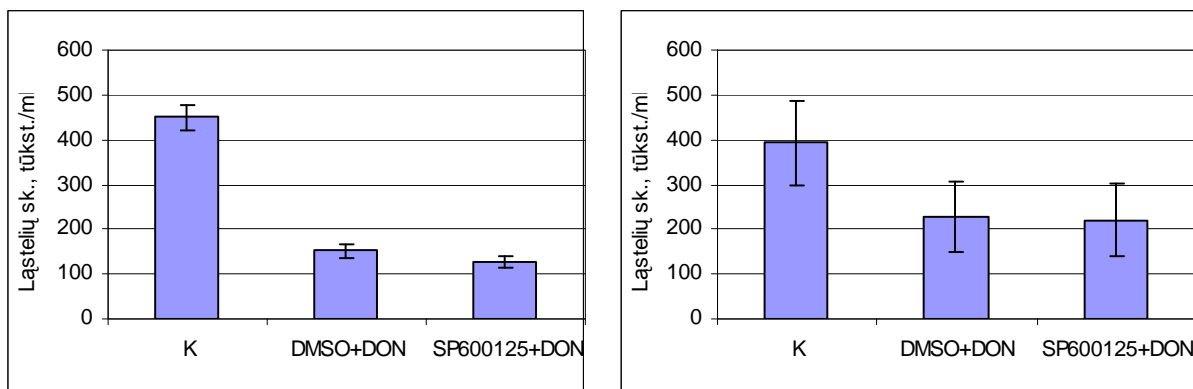
Streso aktyvinama c-Jun N-galinė kinazė yra atsakinga ne tik už apoptozės indukciją, bet ir, priklausomai nuo ląstelinio konteksto, gali lemti ląstelės išgyvenimą [Jin ir kt., 2005]. Siekdami įvertinti JNK vaidmenį Jurkat ir MH-22A ląstelėse po poveikio tiriamais mikotoksinais, mes šią proteinkinazę inhibavome. Tuo tikslu naudojome specifinį JNK inhibitorių SP600125. Tai yra konkurentinis inhibitorius. Jis sudaro vandenilines jungtis su ATP surišančia JNK sritimi ir priklausomai nuo dozės gali efektyviai inhibuoti visas tris JNK izoformas (JNK 1, -2 ir -3) [Bennett ir kt., 2001]. Tyrimams naudojome 20 μM SP600125 koncentraciją. Tiriamos medžiagos buvo dedamos praėjus 30 min. nuo JNK inhibitoriaus pridėjimo. Inhibitorius buvo tirpintas dimetilsulfokside (DMSO), kuris gali įtakoti mikotoksinų veikimą ir būti toksiškas proliferuojančioms ląstelių kultūroms. Todėl pradžioje palyginome CE ir DON poveikį pridėjus DMSO ir be DMSO. Nustatėme, kad DMSO neįtakojo mūsų tiriamų mikotoksinų veikimo. Todėl tolesniuose tyrimuose naudojome vieną kontrolę - DMSO+CE (arba+DON). Efektas buvo registruojamas po 24 poveikio valandų

Kaip matome **19 paveiksle**, kraujo kilmės Jurkat bei kepenų kilmės MH-22A ląstelių jautrumas CE, inhibavus streso kinazę JNK, kiek padidėjo.



19 pav. Jurkat (A) ir MH-22A (B) ląstelių augimo intensyvumo kitimas po 24 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CE poveikio valandų.

Tolesnėje darbo dalyje tyrėme JNK vaidmenį po 24 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DON poveikio valandų. Gauti duomenys rodo, kad JNK inhibicija DON poveikiui įtakos neturėjo abiejose tirtose - Jurkat ir MH-22A - linijų ląstelėse (**20 pav**).



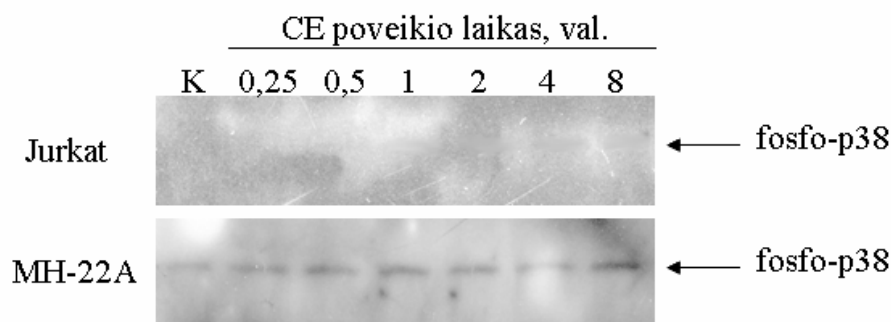
20 pav. Jurkat (A) ir MH-22A (B) ląstelių augimo intensyvumo kitimas po 24 1 $\mu\text{g/ml}$ DON poveikio valandų.

Taigi, JNK MAPK vaidmuo šiuo atveju priklauso nuo atitinkamo mikotoksino poveikio: veikiant tiriamas Jurkat ir MH-22A ląsteles citochalazinu E, JNK vaidmuo – silpnas antiapoptozinis, o deoksinivalenolio poveikio atveju – neutralus.

3.2.2. Citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio p38 MAP kinazės aktyvumui tyrimas

Šioje darbo dalyje nagrinėjome CE ir DON poveikį kitos streso aktyvinamos kinazės - p38 - aktyvumui. Imunoblotingo pagalba po 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ir 8 tiriamų mikotoksinų poveikio valandų Jurkat ir MH-22A ląstelėse buvo vertintas fosfo-p38 lygis.

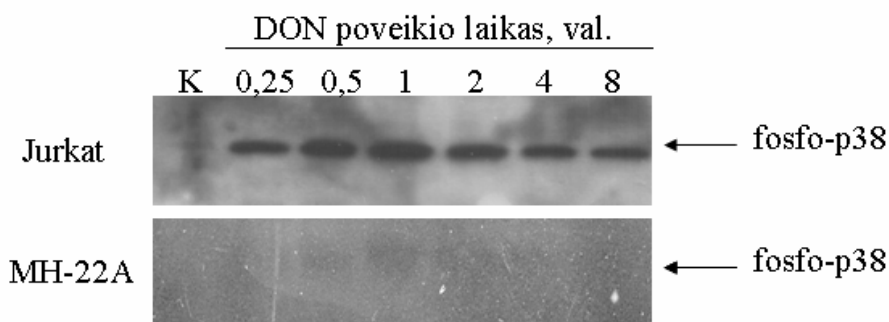
Gauti rezultatai parodė, kad CE neįtakojo fosfo-p38 lygio MH-22A ląstelėse, tačiau Jurkat ląstelėse buvo registruota nežymi ilgalaikė šios MAP kinazės aktyvacija (**21 pav.**).



21 pav. Fosfo-p38 lygis CE paveiktose Jurkat ir MH-22A ląstelėse.

Tuo tarpu DON jau po 0.25 poveikio valandos abiejų tirtų linijų ląstelėse indukavo p38 fosforilinimą bei aktyvaciją. Jurkat ląstelėse didžiausias fosfo-p38 lygis buvo registruojamas

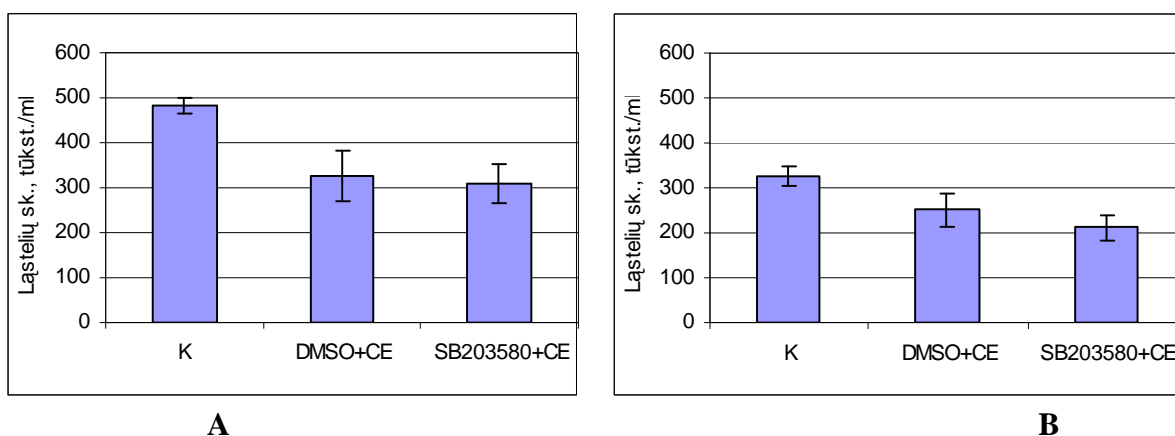
po 0,5 bei po 1 poveikio val. ir palaipsniui mažėjo, o MH-22A ląstelėse išliko pastovus visą tyrimo laiką (22 pav.)



22 pav. Fosfo-p38 lygis DON paveiktose Jurkat ir MH-22A ląstelėse.

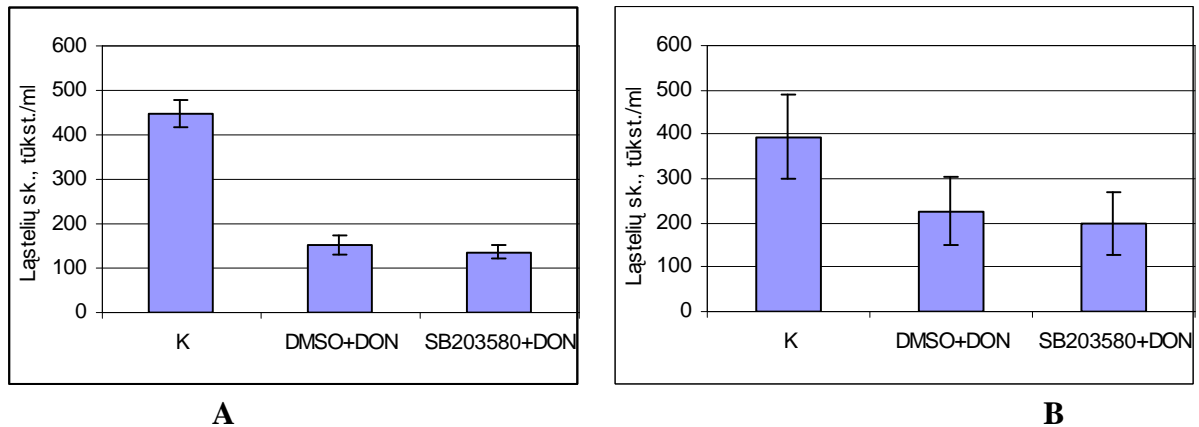
Yra duomenų, kad p38 MAPK gali būti reikalinga ląstelės ciklo slinkčiai: ląsteles paveikus specifiniu p38 MAPK inhibitoriumi SB203580, yra stebimas mažesnis ląstelių augimo intensyvumas [Ono ir kt., 2000]. Kaip ir JNK inhibitorius - SP600125, šis p38 inhibitorius konkuruoja su ATP dėl susirišimo su ATP jungiančia p38 baltymo dalimi. SB203580 selektyviai inhibuoja dvi p38 MAPK izoformas - p38 α ir p38 β [Ambrosino ir kt., 2001]. Mes savo darbe šį inhibitorių panaudojame p38 MAP kinazės vaidmens tyrimams. Tiriami mikotoksinai buvo pridedami praėjus 30 min. nuo 20 μ M SB203580 pridėjimo. Po 24 val. buvo registruojamas tokiu būdu paveiktų Jurkat ir MH-22A ląstelių augimo intensyvumas. Gauti rezultatai buvo lyginami su kontrolinių bei DMSO+CE (arba+DON) paveiktų ląstelių augimo intensyvumu.

Nustatėme, kad p38 MAP kinazės inhibicija beveik neįtakuoja Jurkat ląstelių jautrumo CE, bei nežymiai didina MH-22A ląstelių jautrumą šiam mikotoksiniui (23 pav).



23 pav. Jurkat (A) ir MH-22A (B) ląstelių augimo intensyvumo kitimas po 24 1 μ g/ml CE poveikio valandų.

Šios kinazės inhibicija labai nežymiai padidina Jurkat ir MH-22A ląstelių jautrumą DON (24 pav.). Duomenų apie tai, kad p38 MAPK inhibicija iš dalies gali būti susijusi su DON indukuojama Jurkat ląstelių apoptoze randama ir literatūroje [Pestka ir kt., 2005].



24 pav. Jurkat (A) ir MH-22A (B) ląstelių augimo intensyvumo kitimas po 24 1 $\mu\text{g/ml}$ DON poveikio valandų.

JNK ir p38 MAPK vaidmens, panaudojus specifinius šių kinazių inhibitorius, tyrimas parodė, kad c-Jun N-galinės kinazės inhibicija didino abiejų tirtų ląstelių jautrumą CE, tačiau beveik neįtakoję jų jautrumo DON. Galima teigti, kad padidėjęs JNK aktyvumas apsaugo ląsteles nuo CE indukuojamos programuotos ląstelių žūtis. Mūsų duomenimis, p38 MAPK inhibicija didino MH-22A ląstelių jautrumą CE ir DON, tuo tarpu, Jurkat ląstelės po šios kinazės inhibicijos buvo gana atsparios abiemis tirtiems mikotoksinams.

Taigi, MAP kinazių vaidmuo tirtose Jurkat ir MH-22A ląstelėse yra nevienareikšmis ir priklauso tiek nuo mikotoksino rūšies, tiek nuo ląstelių tipo.

3.3. Protoonkogeno *c-jun* vaidmens tyrimas citochalazino E ir deoksinivalenolio indukuojamuose tiriamųjų ląstelių žūtis procesuose

Pagrindinis c-Jun N-galinės kinazės (JNK) taikinyas ląstelėje, kuri ši kinazė fosforilina ir aktyvina, yra protoonkogenas *c-jun*. Šio protoonkogeno koduojamas baltymas yra pagrindinis transkripcijos faktoriaus AP-1 komponentas. Taigi, signalai aktyvinantys JNK MAP kinazę, taip pat gali indukuoti fosforilinimą ir stimuliuoti transkripcinį c-Jun baltymo aktyvumą [Minden ir kt., 1997]. Yra duomenų apie tai, kad ši protoonkogeną gali netiesiogiai aktyvinti ir kita SAPK – p38 [Karin ir kt., 1997].

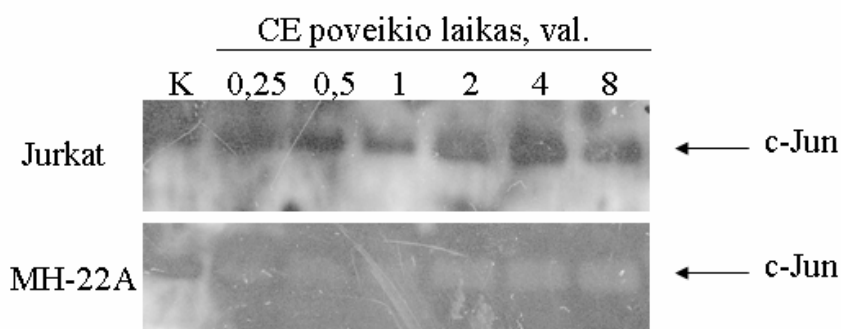
c-Jun yra žinomas kaip galimas apoptozės induktorius [Kim ir kt., 2002]. Todėl šioje darbo dalyje ir siekėme įvertinti protoonkogeno *c-jun*, kaip vieno iš galimų programuotos

ląstelių žūties induktorių vaidmenį. Daugelyje ląstelių *c-jun* raiška yra nedidelė, tačiau ji ypač padidėja, ląstelėms atsakant į įvairius išorinius ir vidinius veiksnius (augimo faktorius, citokinus, UV spinduliavimą) [Karin ir kt., 1997]. Yra nustatytas ir antiapoptotinis bei neutralus *c-jun* vaidmuo. Literatūros duomenimis, *c-jun* vaidmuo ląstelių proliferacijoje ir apoptozės procesuose priklauso nuo ląstelių rūšies, poveikio stiprumo bei trukmės [Komoda ir kt., 2002].

3.3.1. Protoonkogeno *c-jun* raiškos tyrimas po citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio

Norėdami įvertinti tiriamų mikotoksinų įtaką *c-jun* raiškai *in vitro*, šio geno koduojamo baltymo lygį Jurkat ir MH-22A ląstelėse vertinome paveikę jas vienoda - 1 µg/ml - citochalazino E ir deoksinivalenolio koncentracija. Baltymo raiška imunoblotingo pagalba buvo vertinta po 0.25, 0.5, 1, 2, 4, ir 8 poveikio valandų.

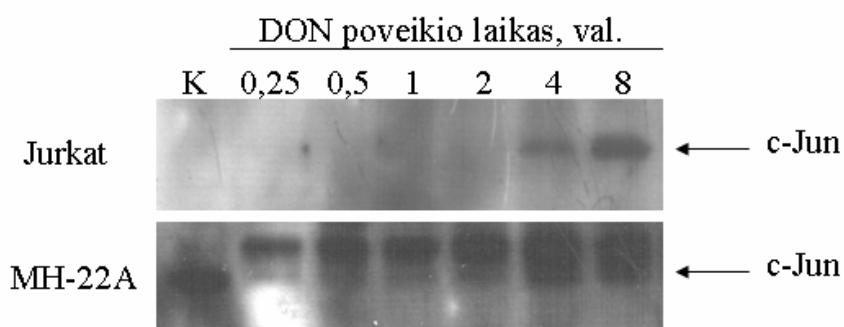
Mūsų gauti rezultatai parodė, kad CE Jurkat ląstelėse indukuoja gana vėlyvą (po 2 poveikio valandų) ir ilgalaikį *c-Jun* baltymo lygio padidėjimą. Tuo tarpu, MH-22A ląstelėse *c-jun* raiškos padidėjimas išryškėja jau po 0.25 val. ir poveikio laikui ilgėjant palaipsniui didėja (**25 pav.**). Yra nustatyta, kad panašiu poveikiu *c-jun* raiškai pasižymi ir kiti citoskeletą ardantys junginiai. Pavyzdžiui, citochalazinas B ir kolchicinas po 30 poveikio min. indukuoja *c-jun* ekspresiją [Oren ir kt., 1999].



25 pav. *c-jun* raiškos palyginimas Jurkat ir MH-22A ląstelėse po CE poveikio.

Toliau vertinome kito mūsų tiriamo mikotoksino - DON poveikį *c-jun* raiškai Jurkat ir MH-22A ląstelėse. Gauti duomenys rodo, kad Jurkat ląstelėse DON indukuoja *c-jun* raišką tik po ilgesnio – 4 val. - poveikio laiko, tačiau tai yra ilgalaikė *c-jun* indukcija. Pelės hepatomos MH-22A ląstelėse yra registruojama konstitutyviai aukšta *c-jun* raiška. Po DON poveikio

stebimas šios raiškos slopinimas. Ilgėjant DON poveikio laikui c-Jun baltymo lygis pradeda didėti ir pasiekia kontrolinių ląstelių lygį (**26 pav.**).



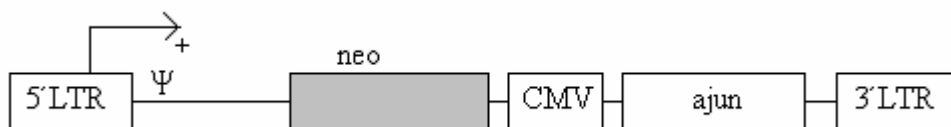
26 pav. *c-jun* raiškos palyginimas Jurkat ir MH-22A ląstelėse po DON poveikio.

3.3.2. *c-jun* vaidmens tyrimas panaudojant parentalines ir genetiškai modifikuotas MH-22A ląsteles

Literatūroje yra nemažai duomenų apie tai, kad *c-jun* gali skatinti ląstelių proliferaciją. Nustatyta, kad ląstelėse, kuriose trūksta funkcionuojančio *c-jun*, vėluoja augimas tiek *in vivo*, tiek *in vitro* [Wetzel ir kt., 1997]. Yra žinomas ir proapoptotinis bei neutralus *c-jun* vaidmuo. Išsamesni *c-jun* vaidmens tyrimai po citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikio buvo atlikti su MH-22A linijos ląstelėmis. Tuo tikslu buvo gautos trys genetiškai modifikuotos *c-jun* atžvilgiu pelės hepatomos ląstelių linijos.

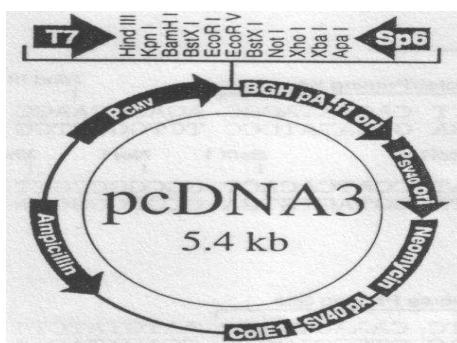
Pirmajai jų gauti buvo panaudotas tuščias vektorius, t.y. *c-jun* raiška šioje vektorinėje ląstelių linijoje (VEKT), nekito ir ji buvo naudojama kaip papildoma kontrolė (**30 pav.**).

Antroje – antisensinėje ląstelių linijoje (AS) buvo siekiama dalinai blokuoti *c-jun* raišką. Tuo tikslu, buvo panaudotas konstruktas su protoonkogeno *c-jun* seka atvirkštinėje orientacijoje citomegalus viruso enhancerio promotoriaus atžvilgiu, kuris paruoštas Vystymosi biologijos laboratorijoje (Biochemijos Institutas) (**27 pav.**). Gautose transfekuotose ląstelių linijose *c-jun* raiška dalinai blokuojama (**30 pav.**).

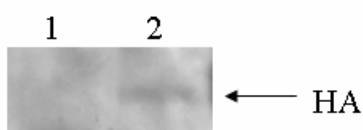


27 pav. Eukariotinio ekspresijos vektoriaus su protoonkogeno *c-jun* seka atvirkštinėje orientacijoje konstruktas.

Trečioji ląstelių linija (JUN) buvo gauta, įvedus į ląsteles pcDNR-Hajun plazmidę sukurtą, pcDNA3 (Invitrogen) vektoriaus (28 pav.), kuris turi CMV ankstyvąjį greitą promotorių su enhanceriu, atsparumus ampicilinui ir geneticinui (G418), taip pat jaučio augimo hormono poliadenilino seka, prailginančią mRNR gyvavimo laiką, įklonavus konstrukta, nešantį su HA sulietą *c-jun* geną. HA - hemagliutininas yra gripo viruso baltymas, sukeliantis stiprų imuninį atsaką, todėl antikūnai prieš HA lengvai gaunami, o nedidelį epitopą koduojanti seka sėkmingai pritaikyta genų žymėjimui. Imunoblotingo pagalba patikrinę HA ekspresiją, vertinome *c-jun* įvedimo laipsnį (29 pav.). Šioje gautoje ląstelių linijoje registruota padidėjusi *c-jun* raiška (30 pav.).



28 pav. pcDNA3 vektorius.



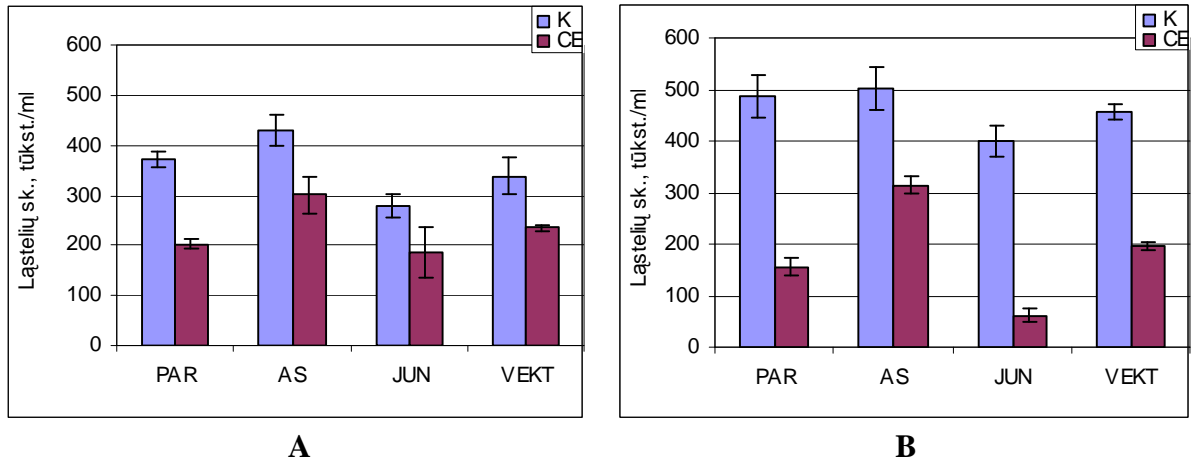
29 pav. HA raiška parentalinėse (1) bei transfekuotose (JUN) (2) MH-22A ląstelėse.



30 pav. *c-jun* raiška parentalinėse ir genetiškai modifikuotose MH-22A ląstelėse: PAR – parentalinės, t.y. genetiškai nepakeistos ląstelės; AS – genetiškai modifikuotos ląstelės, kuriose *c-jun* raiška dalinai blokuota; JUN - genetiškai modifikuotos ląstelės, kuriose *c-jun* raiška padidinta; VEKT - genetiškai modifikuotos ląstelės, kuriose *c-jun* raiška nepakitusi.

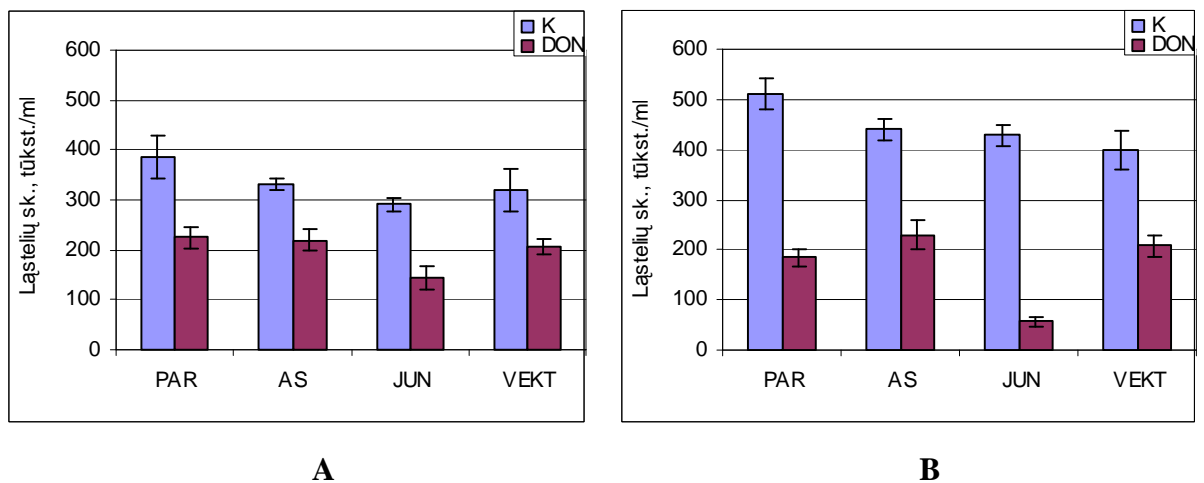
Kadangi mūsų tiriamose parentalinėse ir genetiškai modifikuotose MH-22A ląstelėse yra skirtingas *c-jun* ekspresijos lygis, todėl galima vertinti šio geno koduojamo baltymo vaidmenį ląstelių atsake į CE ir DON poveikį *in vitro*. Tolimesnėje darbo dalyje, panaudodami gautas ląstelių linijas, analizavome protoonkogeno *c-jun* vaidmenį, atsakant į 1 µg/ml CE poveikį.

Nustatėme, kad atspariausios CE poveikiui buvo ląstelės, kuriose yra žemesnis *c-Jun* baltymo lygis, t.y. AS ląstelių linija. Ląstelių linijose, kuriose registruota padidėjusi *c-jun* raiška, stebėtas priešingas efektas – jos buvo jautresnės CE poveikiui nei parentalinės MH-22A ląstelės (**31 pav.**). Ypatingai JUN ląstelių jautrumas išaugo po 48 val. poveikio. Beje, AS ląstelių atsparumas taip pat labiau išryškėjo po 48 val. poveikio.



31 pav. Parentalinių ir genetiškai modifikuotų ląstelių augimo intensyvumo kitimas kontrolinėse bei CE paveiktose ląstelių populiacijose po 24 (A) ir 48 (B) poveikio valandų.

Analogiškas efektas buvo registruotas parentalinėse ir genetiškai modifikuotose MH-22A ląstelėse po 24 ir 48 DON poveikio valandų: jautriausios DON buvo ląstelės, kuriose yra padidinta *c-jun* raiška; AS ląstelių linijoje buvo stebimas priešingas efektas – jos buvo atsparesnės DON poveikiui (**32 pav.**). *c-Jun* vaidmuo, šiuo atveju, taip pat labiau išryškėjo po 48 veikimo tiriamuoju DON mikotoksinu valandų.



32 pav. Parentalinių ir genetiškai modifikuotų ląstelių augimo intensyvumo kitimas kontrolinėse bei DON paveiktose ląstelių populiacijose po 24 (A) ir 48 (B) poveikio valandų.

Taigi, mūsų gauti duomenys parodė, kad c-Jun baltymas dalyvauja MH-22A linijos ląstelių atsake į tiriamų mikotoksinų - CE ir DON - poveikį.

Šiame darbe buvo analizuota dviejų mikotoksinų - citochalazino E ir deoksinivalenolio - vaidmuo skirtingos kilmės ląstelių proliferacijos bei žūties procesuose ir galimų signalinių kelių aktyvacija atsakant į CE ir DON poveikį. Yra žinoma, kad mikotoksinų sukeliamas toksiškumas, ląsteliniame lygyje gali pasireikšti skirtingais mechanizmais ir tai yra susiję su jų chemine struktūra [Duxbury, 2004]. Abu tirti mikotoksinai savo struktūroje turi epoksido grupes, kurios, manoma, lemia jų toksiškumą. Deoksinivalenolio veikimas literatūroje yra žymiai plačiau išnagrinėtas. Nustatyta, kad 4.5 - 41 μM šio mikotoksino koncentracijos 50% gali slopinti ląstelių proliferaciją. Šiuo atveju DON veikimas priklauso nuo ląstelių rūšies. Yra duomenų, kad mažos DON koncentracijos indukuoja mitogenų aktyvinamas kinazes - p38, JNK1/2 ir ERK [Pestka ir kt., 2005]. Šių MAP kinazių vaidmuo ląstelėje yra nevienareikšmis ir gali varijuoti priklausomai nuo poveikio ar ląstelių tipo. Apie tai byloja daug literatūros šaltinių [Minden ir kt, 1997; Finley ir kt, 2003; Huh ir kt., 2004].

Savo darbe modeline sistema pasirinkome dvi skirtingos kilmės ląstelių linijas: kepenų kilmės pelės hepatomos MH-22A ląstelių liniją ir kraujo kilmės Jurkat ląstelių liniją. Tyrimams naudojome 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ CE ir DON koncentracijas. Stipriausiu antiproliferaciniu poveikiu tirtose ląstelių kultūrose pasižymėjo DON. Ypač stipriai Jurkat ir MH-22A ląstelių augimą slopino didžiausia tirta DON koncentracija. CE kiek silpniau įtakojo tirtų ląstelių proliferaciją. Tačiau poveikio laikui ilgėjant ir didėjant CE koncentracijai, antiproliferacinis veikimas sustiprėjo. Įdomūs rezultatai buvo gauti paveikus MH-22A ląstelės 1 $\mu\text{g/ml}$ CE. Ši CE koncentracija pasižymėjo stipriausiu antiproliferaciniu bei programuotą ląstelių žūtį indukuojančiu veikimu. 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ir 10 $\mu\text{g/ml}$ CE koncentracijos nebuvo tokios efektyvios.

Mitogenų aktyvinamų proteinkinazių kinazių kaskada yra viena iš svarbiausių signalinių kelių, lemiančių ląstelių atsaką į įvairius išorinius ir vidinius poveikius. Mūsų darbe buvo analizuojamas tiriamų mikotoksinų poveikis dviejų MAP kinazių - p38 ir JNK - aktyvumui. Nustatėme, kad tiek CE, tiek DON mūsų tirtose ląstelėse aktyvino JNK, o inhibavus JNK, Jurkat ir MH-22A ląstelių jautrumas CE padidėjo. Gautus rezultatus lyginome su duomenimis, gautais paveikus tiriamas ląsteles DON. Šiuo atveju JNK aktyvacija nekeitė Jurkat ir MH-22A ląstelių jautrumo DON. Panašių duomenų apie DON poveikį kitoms ląstelėms randama ir literatūroje [Pestka ir kt., 2005].

Abi šios tirtos MAP kinazės gali tiesiogiai ar netiesiogiai aktyvinti protoonkogeną *c-jun*, kuris yra pagrindinis transkripcijos faktoriaus AP-1 komponentas. Todėl panaudojus genetiškai modifikuotas *c-jun* atžvilgiu MH-22A ląstelių linijas, buvo vertintas c-Jun vaidmuo po CE ir DON poveikio. Jautresnės CE ir DON buvo tos genetiškai modifikuotos ląstelės, kuriose yra padidinta *c-jun* raiška. Tuo tarpu dalinis *c-jun* raiškos slopinimas didino ląstelių atsparumą tiriamiems mikotoksinams, o po CE poveikio netgi stebėtas didesnis tiriamų ląstelių augimo intensyvumas. Taigi, c-Jun yra svarbus pelės hepatomos linijos ląstelėms atsakant į tirtų mikotoksinų poveikį. Šiuo atveju, c-Jun vaidmuo yra proapoptozinis.

IŠVADOS

1. Įvertinus citochalazino E ir deoksinivalenolio, turinčių savo struktūroje epoksido grupes, poveikį eukariotinių ląstelių gyvybingumui, nustatytas skirtingas MH-22A ir Jurkat linijų ląstelių jautrumas tirtiems mikotoksinams.
2. Nutatyta, kad stipriausiu proliferaciją slopinančiu aktyvumu tirtose ląstelių kultūrose pasižymėjo deoksinivalenolis. Citochalazinas E silpniau įtakojo abiejų linijų ląstelių proliferaciją, nors poveikio laikui ilgėjant ir didėjant mikotoksino koncentracijai, antiproliferacinis jo veikimas stiprėjo.
3. Citochalazinas E neįtakojo fosfo-p38 lygio MH-22A ląstelėse, bet nežymiai aktyvino šią MAP kinazę Jurkat ląstelėse. Tuo tarpu deoksinivalenolis indukavo greitą ir ilgalaikę p38 MAPK aktyvaciją abiejose tirtose ląstelių linijose.
4. JNK MAPK vaidmuo priklausė nuo atitinkamo mikotoksino poveikio: veikiant tiriamas Jurkat ir MH-22A ląsteles citochalazinu E, JNK vaidmuo – silpnas antiapoptozinis, o deoksinivalenolio poveikio atveju – neutralus.
5. MH-22A linijos ląstelės, kuriose yra padidinta *c-jun* raiška buvo žymiai jautresnės citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikiui, tuo tarpu – *c-jun* raiškos dalinis slopinamas, didino šių ląstelių atsparumą tirtiems mikotoksinams. Tai rodo, kad c-Jun dalyvauja MH-22A linijos ląstelių atsake į citochalazino E ir deoksinivalenolio poveikį.

Darbą atliko:

Darbo vadovė:

SUMMARY

Study of mechanisms underlying cytochalasin E and deoxynivalenol effects in MH-22A and Jurkat cell lines

In recent years, a great deal of interest has been generated regarding the study food safety. The Food and Agriculture Organization estimates that at least 5-10% of the world food supply is lost annually to fungi and mycotoxins – poisonous chemicals produced by microfungi during their growth on food, feeds and various agricultural commodities. The effects of mycotoxins on humans and animals are dose-related and include acute and chronic effects, in the case of some mycotoxins, carcinogenicity, mutagenicity and suppression of the immune system. Deoxynivalenol, one of mycotoxins, is produced by several *Fusarium* genus. It can be found as natural contaminant in various cereal crops and in processed grains. Besides its acute and chronic toxicity and effects on immune function, deoxynivalenol contribute to gastrointestinal diseases in exposed humans. Cytochalasin E – a toxin synthesized by *Aspergillus clavatus*, that inhibit cell division and protein synthesis, is nephrotoxic and considered carcinogenic.

The aim of this study was to assess the effects of deoxynivalenol and cytochalasin E on cell viability and to relate apoptosis to activation of signaling molecules of stress activated MAPK pathway.

In our study we determined, that cytochalasin E and deoxynivalenol mechanism of action depends on cell type, concentration and time of exposure. Deoxynivalenol was marked the most potent cytotoxicity in both cell lines at greatest concentration. Meanwhile cytochalasin E showed weaker influence on cell proliferation.

The activation and role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 kinase, members of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) family, was studied, also. Our results suggest a possible involvement of JNK in cytochalasin E induced apoptosis in Jurkat and MH-22A cells, but in deoxynivalenol treated cells this effect was inappreciable. The study of p38 MAPK activation in Jurkat and MH-22A cells after deoxynivalenol treatment revealed a markedly induced phosphorylation of this kinase that correlated with and preceded apoptosis. Our results showed that cytochalasin E didn't provoke the activation of p38 in Jurkat cells and weak increase of phospho-p38 level in MH-22A cell line.

Study of the role of protooncogene *c-jun* was carried out by using genetically modified MH-22A cells. The results indicated proapoptotic effect of *c-jun* after studied mycotoxins treatment in this cell line.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Albricht D. M. (2001). Human health effects of airborne mycotoxin exposure in fungi – contaminated indoor environments. *Professional Safety*. 26-28.
2. Ambrosino C., Nebreda A. R. (2001). Cell cycle regulation by p38 MAP kinases. *Biology of the Cell*. 93: 47-51.
3. Azuma Y., Inami Y., Matsumoto K. (2002). Alterations in cell surface phosphatidylserine and sugar chains during apoptosis and their time-dependent role in phagocytosis by macrophages. *Biol. Phar. Bull.* 25(10): 1277-1281.
4. Barišić K., Petrik J., Rumora L. (2003). Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm.* 53: 151-164.
5. Bennet J. W., Klich M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(3): 497-516.
6. Bennett, B. L., Sasaki, D. T., Murray, B. W., O'Leary, E. C., Sakata, S. T., Xu, W., Leisten, J. C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S. S., Manning, A. M., and Anderson, D. W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *PNAS* 98(24): 13681-13686.
7. Berger W., Micksche M., Elbling L. (1997). Effect of multidrug resistance-related ATP-binding-cassette transporter proteins on the cytoskeletal activity of cytochalasins. *Experimental Cell Research*. 237(2): 307-317.
8. Bhatnagar D., Yu J., Ehrlich K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chem Immunology*. 81: 167-206.
9. Burek C. J., Burek M., Roth J., Los M. (2003). Calcium induces apoptosis and necrosis in hematopoietic malignant cells: evidence for caspase-8 dependent and FADD- autonomous pathway. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 7: 173-179.
10. Chandra D. (2004). Apoptosis and its implications in cancer therapy. UT/Science Park Summer Lecture Seminars.
11. Chang L., Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410: 37- 40.
12. Coleman M. L., Marshall C. J., Olson M. F. (2004). Ras and Rho GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nature Reviews*. 5: 355-366.
13. Chung Y.-J., Yang G.-H., Islam Z., Pestka J. J. (2003). Up-regulation of macrophage inflammatory protein-2 and complement 3A by the trichotecenes deoxynivalenol and satratoxin G. *Toxicology*. 186: 51-65.
14. Cooper J. A. (1987). Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. *J. Cell Biol.* 105: 1473-1478
15. Cooper S. (2003) Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G₀, and G₁ phase arrest points. *FASEB Journal*. 17: 333-340.
16. Demain A. (1986). Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure & Applied. Chemistry*. 58(2): 219-226.
17. Duxbury D. (2004). Testing for mycotoxin control. *Food Technology*. 58(11): 78-80.
18. Eferl R., Ricci R., Kenner L., Zenz R., David J.-P., Rath M., Wagner E. F. (2003). Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell*. 122: 181-192.
19. Eferl R., Wagner E. F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews*. 3: 859-868.
20. Eriksen G. S., Pettersson H., Lundh T. (2004). Comparativ cytotoxicity of deoxynivaleno, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food and Chemical Toxicology*. 42: 619-624.
21. Fesik S. W. (2000). Insights into Programmed Cell Death through structural biology. *Cell*. 103: 273-282.
22. Finley C.-B., Lyle C. S., Du L., Goodwin M. E., Hall T., Szwedo D., Kaushal G. P., Chambers T. C. (2003). The JNK, ERK, and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochemical Pharmacology*. 66: 459-469.
23. Fornelli F., Minervini F., Mule G. (2004). Cytotoxicity induced by nivaleno, deoxynivalenol, and fumonisin B1 in the SF-9 insect cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 40(5-6): 166-171.
24. Garret M. D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science*. 81: 515-522.
25. Giganti A., Friederich E. (2003). The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Progress in Cell Cycle Research*. 5: 511-525.
26. Glinesukon T., Shank R. C., Wogan G. N., Newberne P. M. (1975). Acute and subacute toxicity of cytochalasin E in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 32(1): 135-146.
27. Goldman R. D. (1972). The effect of cytochalasin B on the microfilament of Baby Hamster Kidney (BHK-21) cells. *The Journal of Cell Biology*. 52: 246-254.
28. Gottscalk I., Lundqvist A., Zeng C.-M., Hägglung C. L., Zuo S.-S., Brekkan E. B., Eaker D., Lundahl P. (2000). Conversion between two cytochalasin B-binding states of the human GLUT1 glucose transport. *FEBS*. 267: 2875-2882.
29. Grethe S., Ares M. P., Andersson T., Ares I. P. (2004). p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x_L. *Experimental Cell Research*. 298: 632-642.

30. Gupta S. (2003). Molecular signalling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *International Journal of Oncology*. 22: 15-20.
31. Gupta P., Prywes R. (2002). ATF1 phosphorylation by the ERK MAPK pathway is required for Epidermal Growth Factor – induced c-jun expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 50550-50556.
32. Haidle A., Myers A. (2004). An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: Synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 2048-12053.
33. Halaby R., Ochoa C., Rios A. (2003). Microfilament alterations in human breast carcinoma cells undergoing apoptosis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 8: 67-71.
34. Heiling C., Brosius F., Siu B., Concepcion L., Mortensen R., Heiling K., Zhu M., Weldon R., Wu G., Conner D. (2003). Implications of Glucose Transporter Protein Type 1 (GLUT1)-haplodeficiency in embryonic stem cells for their survival in response to hypoxic stress. *American Journal of Pathology*. 163: 1873-1875.
35. Hengartner M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-774.
36. Horbinski C., Chu C. T. (2005). Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radical Biology & Medicine*. 38: 2-11.
37. Huang S., Ingber D. E. (2002). A discrete cell cycle checkpoint in late G₁ that is cytoskeleton-dependent and MAP kinase (Erk)-independent. *Experimental Cell Research*. 275: 255-264.
38. Huh J.-E. (2004). Roles of p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways during catharidin-induced apoptosis in U937 cells. *Biochemical Pharmacology*. 67: 1811-1818.
39. Huynh H., Do P.T., Nguyen T. H., Tan P. H., Quach T. H., Van T., Soo K. C., Tran E. (2004). Extracellular signal-regulated kinase induces cyclin D1 and Cdk-2 expression and phosphorylation of retinoblastoma in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Oncology*. 25: 1839-1847.
40. Ip Y. T., Davis R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) – from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*. 10: 205-219.
41. Jarvis B., Shaefer E. M., Miller D. T. (1997). Detection of JNK, p38 and MAPK enzyme activation using anti-dual phosphopeptide antibodies: coordinated signalling of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) superfamily. *Promega Notes Magazine*. 63:
42. Jin Z., Deiry W. S. E. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*. 4: 50-74.
43. Johnstone R. W., Ruefli A. A., Lowe S. W. (2002). Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 108: 153-164.
44. Johnson D. G., Walker C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 295-312.
45. Kaminska B., Pyrzynska B., Ciechomska M., Wisniewska M. (2000). Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol. Exp.* 60: 395-402.
46. Karin M., Liu Z. G., Zandi E. (1997). AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 9: 240-246.
47. Kasten M., Barket J. (2004). Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432: 316-323.
48. Kim C. K., Lim S. J. (2002). Recent progress in drug delivery systems for anticancer agents. *Arch Pharm Res.* 25: 229-239.
49. Komoda F., Shino Y., Hirano T., Okutomi Y., Okamoto H., Hayashi Y., Suyama T., Ebara M., Saisho H., Shirasawa H. (2002). MEKK1 induces c-Jun complexes that act as negatives regulators for cell survival and proliferation of HCC cells. *International Journal of Oncology*. 21: 553-559.
50. Kuwana T., Newmeyer D.D. (2003). Bcl-2 – family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 15: 691-699.
51. Larsen J. C., Hunt J., Perrin I., Ruckebauer P. (2004). Workshop on trichotecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicology Letters*. 153: 1-22.
52. Lawen A. (2003). Apoptosis – an introduction. *BioEssays*. 25: 888-896.
53. Liebermann D.A., Gregory B., Hofman B. (1998) AP-1 (Fos/Jun) transcription factors in hematopoietic differentiation and apoptosis. *International Journal of Oncology* 12:685-700.
54. IMacFarlane M., Williams A.C. (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 5(7):674-678.
55. Makioka A., Kumagai M., Kobayashi S., Takeuchi T. (2004). Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitology Research*. 1-7.
56. Maresca M., Mahfoud R., Garmy N., Fantini J. (2002). The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. *J Nutr.* 132: 2723-2731.
57. May G. H. W., Allen K. E., Clark W., Funk M., Gillespie D. A. F. (1998). Analysis of the interaction between c-Jun and c-Jun N-terminal kinase *in vivo*. *J Biol Chem*. 273: 33429-33435.
58. Mercille S., Massie B. (1994). Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotech. Bioeng.* 44: 1140-1150.
59. Mills J., Pedersen S. F., Walmod P. S., Hoffmann E. K. (2000). Effect of cytochalasins on F-actin and morphology of Ehrlich ascites tumor cells. *Experimental Cell Research*. 261: 209-219.

60. Minden A., Karin M. (1997). Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1333: 85-104.
61. Moon Y., Pestka J. J. (2002). Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicological Sciences*. 69: 373-382.
62. Ornelles et al. (1986) Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Mol. Cell Biol*. 6:1650-1662.
63. Nelson D. A., Eileen W. (2004). Exploiting different ways to die. *Genes & Development*. 18: 1223-1226.
64. Ono K., Han J. (2000). The p38 signal transduction pathway action and function. *Cellular signalling*. 12: 1-13.
65. Oren A., Herschkovitz A., Ben – Dror I., Holdengreber V., Ben Shaul Y., Seger R., Vardimon L. (1999). The cytoskeletal network controls c-Jun expression and glucocorticoid receptor transcriptional activity in an cell-type-specific manner. *Molecular Cell Biology*. 19(3): 1742-1750.
66. Orrenius S. (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology Letters*. 149: 19-23.
67. Ott M., Robertson J. D., Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *PNAS*. 99: 1259-1263.
68. Papadakis E. S., Finegan K. G., Wang X., Robinson A. C., Guo C., Kayahara M., Tournier C. (2006). The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. *FEBS Letters*. 580: 1320-1326.
69. Pestka J. J., Uzarski R. L., Islam Z. (2005). Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes. *Toxicology*. 206: 207-219.
70. Peterson J. R. and Mitchison T. J. (2002) Small Molecules, Big Impact: A History of chemical Inhibitors and the Cytoskeleton. *Chemistry & Biology*, 9; 1275–1285.
71. Pramanik R., Qi X., Borowicz S., Choubey D., Schultz R. M., Han J., Chen G. (2003). p38 isoforms have opposite effect on AP-1-dependent transcription through regulation c-Jun. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 4831-4839.
72. Robinson M. J., Cobb M. H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 9: 180-186.
73. Rossi D., Gaidano G. (2003). Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*. 88: 212-218.
74. Rotter B. A., Prelusky D. B., Pestka J. J. (1996). Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 48(1): 1-34
75. Rubstova S. N., Kondratov R. V., Kopnin P. B., Chumakov P. M., Kopnin B. P., Vasiliev. (1998). Disruption of actin microfilaments by cytochalasin D leads to activation of p53. *FEBS*. 430: 353-357.
76. Roux P. P., Blenis J. (2004). ERK and p38 MAPK- activated protein kinase: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68: 320-344.
77. Takizawa C. G., Morgan D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 658-665.
78. Thorburn A. (2004). Death receptor – induced cell killing. *Cellular Signalling*. 16: 139-144.
79. Sabapathy K., Hu Y., Kallunki T., Schreiber M., David J.-P., Jochum W., Wagner E. F. Karin M. (1999). JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Current Biology*. 9: 116-125.
80. Shaulian E., Schreiber M., Piu F., Beeche M., Wagner E. F., Karin M. (2000). The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*. 103: 897-907.
81. Sherr C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science*. 274: 1672-1677.
82. Shifrin V. I., Anderson P. (1999). Trichotecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(20): 13985-13992.
83. Simon H.-U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 5(5):415-418.
84. Singh J., Hood R. D. (1987) Effects of protein deficiency on the teratogenicity of cytochalasins in mice. *Teratology*. 35(1): 87-93.
85. Sudo T., Maruyama M., Yagasaki Y., Osada H. (2001). Over the stress responses: functional analyses of p38 α . *RIKEN Review*. 41: 64-66.
86. Suria H., Chau L. A., Negrou E., Kelvin D J., Madrenas J. (1999). Cytoskeletal disruption induces T cell apoptosis by a caspase-3 mediated mechanism. *Life Sciences*. 65(25): 2697-2707.
87. Syntichaki P., Tavernarakis N. (2002). Death by necrosis. *EMBO reports*. 3: 604-609.
88. Takizawa C. G., Morgan D. O. (2000). Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Current Opinion in Cell Biology*. 12: 658-665.
89. Tamrakar S., Rubin E., Ludlow JW. (2000) Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci*. 5:D121-37.
90. Thorburn A. (2004). Death receptor – induced cell killing. *Cellular Signalling*. 16: 139-144.

91. Udagawa T., Yuan J., Panigrahy D., Chang Y.-H., Shah J., D'Amato R. (2000). Cytochalasin E, an epoxide containing *Aspergillus*-derived fungal metabolite, inhibits angiogenesis and tumor growth. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 294: 421-427.
92. Veselká R., Zitterbart K., Jelínková S., Neradil J., Svoboda A. (2003). Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncology Reports*. 10: 1049-1058.
93. Vogt P. K. (2001). Jun, the oncoprotein. *Oncogene*. 20: 2365-2377.
94. Vousden K. H. (2002). Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1602: 47-59.
95. Wainwright L. J., Lasorella A., Iavarone A. (2001). Distinct mechanisms of cell cycle arrest control the decision between differentiation and senescence in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(16): 9396-9400.
96. Wei M., Ma W. L., Mao X. M., Song Y. B., Zhang B., Feng C. Q., Zheng W. L. (2002). Proliferation and denucleation of K562 cells induced by cytochalasin B. *Di Yi Jun Yi Da Xue*.
97. Wells J. M Cole R. J., Cutler H. C., Spalding D. H. (1981) *Curvularia lunata*, a New Source of Cytochalasin B. *Applied and Environmental Microbiology* 41(4): 967-971.
98. Wetzel B.-E., Bakiri L., Yaniv M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *The Embo Journal*. 16(7): 1695-1709.
99. Wisdom R., Johnson R.S., Moore C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *The EMBO Journal*. 18: 188-197.
100. Wolf I. M., Seger R. P. (2002). The mitogen-activated protein kinase signalling cascade: from bench to bedside. *IMAJ*. 4: 641-647.
101. Xie X., Lemcke T., Gussio R., Zaharevitz D. W., Leost M., Meijer L., Kunick C. (2005). Epoxide-containing side chains enhance antiproliferative activity of paullones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 40: 655-661.
102. Yang G. H., Jarvis B. B., Chung Y. J., Pestka J. J. (2000). Apoptosis induction by the satratoxins and others trichotecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicology & Applied Pharmacology*. 164(2): 149-60.
103. Zeiss C. J. (2003). The apoptosis – necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol*. 40: 481-495.
104. Zhang P., Nicholson D. E., Bujnicki J.M., Brendle J. J., Ferdig M., Kyle D. E., Milhous W. K., Chiang P. K. (2002). Angiogenesis inhibitors specific for methionine aminopeptidase 2 as drugs for malaria and leishmaniasis. *Journal of Biomedical Science*. 9: 34-40.
105. Zhang W., Liu H. T. (2002). MAPK signal pathway in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 12: 9-18.
106. Zhou H.-R., Islam Z., Pestka J. J. (2005). Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichotecene deoxynivalenol. *Toxicological Science*. 87(1): 113-121.
107. Zhou H.-R., Lou A. S., Pestka J. J. (2003). Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response. *Toxicological Science*. 74: 335-344.
108. www.cred.mdanderson.org/surp/resources/Apoptosis.pdf
109. Гельштейн В.И. (1954). Перевиваемый штам экспериментального рака печени (гепатома XX11). В сб. *Вопр. онк.* 7:54-63.
110. Алексанян Ю.Т., Басмаджян М.Е., Мовсесян К.С., и др. (1972). Линия перевиваемой мышинной гепатомы. *Бюл. Эксп. Биол. Мед.* 5:94-95.

Nuoširdžiai dėkoju už pagrindines idėjas ir vertingus patarimus Vystymosi biologijos skyriaus doktorantei Daivai Baltriukienei; už linksmą nuotaiką, supratimą ir pagalbą Vivariumo skyriaus darbuotojoms: biologei - tyrėjai Audronei Packevičienei ir Elenutei Šeduikienei.