

VILNIAUS UNIVERSITETAS

KĘSTUTIS SUŽIEDĖLIS

**SIGNALINIŲ KELIŲ TYRIMAI LĄSTELIŲ ATSAKO  
Į APLINKOS POVEIKĮ VERTINIMUI**

Habilitacijos procedūrai teikiamų mokslo darbų apžvalga

Fiziniai mokslai, biochemija (04P)

Vilnius, 2009

## ĮVADAS

Vienas esminių gyvybės bruožų – gebėjimas prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Dėl aplinkos poveikio kinta tiek prokariotiniai, tiek vienaląsčiai ir daugialąsčiai eukariotiniai organizmai, todėl nenuostabu, kad tam tikri gyvų ląstelių pasitelkiami atsako į aplinką ar poveikį būdai yra universalūs. Vienas tokių universalių su atsaku į aplinką susijusių reiškinių yra signalinių molekulių ir signalo perdavimo kelių egzistavimas įvairiausiose gyvybės formose, nuo bakterijų iki žinduolių ląstelių. Signalo perdavimo sistemos elementus pagal jų atliekamą funkciją signalo perdavimo kelyje galima suskirstyti į aplinkos arba poveikio jutiklius, tarpininkus, signalo transduktorius ir efektorius, kurių funkciją dažnai atlieka įvairūs transkripcijos veiksniai, aktyvinantys atsako į poveikį sistemas (1 pav.) (Niida and Nakanishi, 2006). Vienokią funkciją signaliniame kelyje atliekančios molekulės nebūtinai yra vienodos biocheminės prigimties ir vienodos lokalizacijos ląstelėje, todėl pagal atliekamą funkciją suskirstytos signalinės molekulės gali būti klasifikuojamos ir pagal jų lokalizaciją (pvz. transmembraniniai receptoriai (Hendrickson, 2005)) ir biocheminę prigimtį.

Ląstelių atsako į aplinkos poveikį tyrimai ir vertinimas yra svarbūs ne tik siekiant geriau suprasti gyvų sistemų prisitaikymo prie aplinkos principus, bet taip pat ir siekiant tobulinti biotechnologinius procesus, kuriant priešmikrobinius ar kitus klinikinius preparatus, naujus įvairių patologijų gydymo būdus ir strategijas.

Konkrečios ląstelės reakciją į aplinką ne visuomet lengva įvertinti, stebint daugialąstį organizmą, bet tai nereiškia, kad atskirų daugialąsčio organizmo ląstelių atsako į aplinką tyrimai yra nesvarbūs. Priešingai, konkrečių daugialąsčio organizmo ląstelių atsako tyrimai ir vertinimas yra netgi svarbesnis, nes reikia įvertinti būtent analizuojamų ląstelių (pvz. naviko ląstelių) atsaką, o skirtingų daugialąsčio organizmo ląstelių atsakas dažniausiai skiriasi.

Signalo perdavimo sistemos elementai kinta signalo perdavimo metu, todėl, analizuojant signalo perdavimo kelių elementus – signalines molekules, galima įvertinti ar ląstelė „pajuto“ aplinkos poveikį, ar aktyvintos atsako į poveikį sistemos. Taigi signalo perdavimo elementų analizė gali būti naudojama kaip ląstelės atsako į poveikį vertinimo įrankis.



1 pav. Signalų perdavimo ląstelėje schema (pagal Niida and Nakanishi, 2006)

Žinduolių ląstelėse nustatyta daugiau nei 3000 baltymų – signalinių kelių komponentų, kuriais valdoma ląstelių proliferacija, diferenciacija, migravimas, išlikimas ar žūtis. Tokia signalinių baltymų gausa ir dažnas signalo perdavimo elementų gebėjimas sąveikauti su daugiau nei vienu sekančiu signaliniame kelyje esančiu ar jį įtakojančiu (prieš jį signaliniame kelyje esančiu) signaliniu komponentu, signalinių kelių tyrimus paverčia tikru iššūkiu tyrėjams.

Iki pogenominės eros, kol nebuvo sukurti visuminių (angl. *global*) tyrimų metodai, tyrėjai galėjo vertinti tik pavienių ląstelės sistemų funkcionavimą. Šiame laikotarpyje, pasitelkus atskirų genų aktyvinimo-slopinimo metodus, buvo nustatytos atskirų signalinių baltymų ar atsako sistemų baltymų funkcijos, atskleidusios ne tik ląstelių prisitaikymo prie aplinkos sistemų įvairovę, bet taip pat šių sistemų, persipynusių signaliniais keliais, tarpusavio ryšius.

Atsižvelgiant į funkcionuojančių gyvybės prisitaikymo prie aplinkos sistemų įvairovę ir jų tarpusavio ryšius, ląstelės atsako į aplinkos poveikį vertinimas tampa labai kompleksiniu uždaviniu, todėl signalinių kelių tyrimai, padedantys atskleisti skirtingų ląstelės sistemų ryšius ir būsenas, įgauna naują sistemų biologijos įrankio prasmę.

Šios apžvalgos ir apžvelgiamų darbų tikslas – apibendrinant tyrinėtų skirtingų signalinių kelių funkcionavimą, skirtingų modelinių sistemų ląstelėms reaguojant į aplinką, pademonstruoti signalinių kelių ir signalo perdavimo elementų tyrimų kaip įrankio vertinant ląstelių atsaką į poveikį svarbą ir atkreipti dėmesį į visuminių tyrimų (angl. *global*) svarbą, siekiant geriau įvertinti ląstelių reakciją į poveikį.

Šioje apžvalgoje nagrinėjama:

1. Eukariotų signalinių kelių komponentai – Ras šeimos baltymų funkcijos mejozėje;
2. Prokariotų signalinių kelių komponentai – bakterijų atsako į rūgštinių aplinkos stresą sistema;

3. Sutrikusių funkcijų (vėžinių) ląstelių atsakas į taikomą terapiją – signalinių elementų atsako į terapiją vertinimui paieška;
4. Signalinių kelių komponentų tyrimai pogenominėje eroje – kokybiškai naujas tyrimų etapas.

### **1. Eukariotų signalinių kelių komponentų – Ras šeimos baltymų funkcijos mejozėje**

Ras šeimos baltymai yra vienas universalių signalo iš aplinkos perdavėjų (angl. *transducers*) į ląstelę pavyzdys. Dalyvaudami daugelyje signalinių kelių, Ras šeimos baltymai valdo daugelį biologinių vyksmų, todėl nenuostabu, kad Ras baltymų funkcijos signaliniuose keliuose yra labiausiai tyrinėjamas Ras baltymų aspektas (Raaijmakers and Bos, 2008).

Periodinis ląstelių dalijimasis (dalijimosi ciklas) ne tik priklauso nuo aplinkos veiksnių, bet taip pat įtakoja ląstelės atsaką į aplinkos poveikį, nes ląstelės, esančios skirtingose dalijimosi fazėse, skirtingai reaguoja į aplinkos veiksnius (Sužiedėlis ir kt., 2008). Ląstelių dalijimuisi tirti naudoti įvairiausi tyrimo modeliai. Vienas jų – Afrikos naguotosios varlės (*Xenopus laevis*) ovocitai, dažnai naudojami ląstelės dalijimosi ciklo tyrimuose (Olive et al., 2003, Vargas et al., 2004). Vilniaus universitete, bendradarbiaudami su Paryžiaus P. ir M. Kiuri universiteto vystymosi biologijos skyriaus mokslininkais, sukūrėme infrastruktūrą, reikalingą tokiems tyrimams.

*X. laevis* ovocitas kaip tyrimo objektas tyrėjus domina neatsitiktinai – tai labai didelė ląstelė (jos diametras ~ 1,2 mm), todėl mikromanipuliacijos su ja (mikroinjekcija, branduolio išskyrimas) yra palyginti nesudėtingos. *X. laevis* ovocitai lengvai išimami iš gyvūnų patelių chirurginiu būdu. Ovocitų dalijimosi ciklas natūraliai sustojęs pirmojo mejozinio dalijimosi profazėje, o tolesnis dalijimasis neprasideda tol, kol ląstelės nepaveikiamos išoriniu induktoriumi – progesteronu. Dar viena molekulinės biologijos tyrėjams svarbi *X. laevis* ovocitų savybė – gebėjimas išlaikyti natyvias baltymų struktūras įvairiausių stresų metu, kai padidėja baltymų denatūracijos tikimybė (Sužiedėlienė et al., 2000). Taigi *X. laevis* ovocitai – natūraliai sinchronizuotos ląstelės, pasiruošusios priimti išorinį signalą ir gamtiniu būdu į jį reaguoti net ir tada, kai eksperimento sąlygos gerokai skiriasi nuo gamtinių – t.y., jas patogiu būdu naudoti signalo perdavimo į ląstelės vidų tyrimams.

Pirmieji Ras baltymų funkcijų *X. laevis* ovocituose tyrimai pradėti 1988 m. Pademonstruota, kad onkogeninis H-Ras baltymas sukelia mejozinį brendimą ir gali būti progesterono indukuojamo signalo perdavimo kelio dalimi (Allende et al., 1988). Tam, kad signalinio kelio elementus būtų galima naudoti ląstelės atsako į išorinį stimulą (poveikį)

vertinimui, būtina nustatyti gamtinius signalinio kelio į stimulą elementus ir susieti, kokios signalinės molekulės būdingos ląstelei vienokios ar kitokios reakcijos metu (būtina nustatyti, kokie ir kokių signalinių molekulių pokyčiai apsprendžia vieną ar kitą ląstelės atsaką).

Ras didšeimės baltymai – maži 20 – 40 kDa monomeriniai baltymai. Jie dar vadinami mažais G baltymais, nes prijungia ir skaldo guanino nukleotidus – yra GTP hidrolazės (Donovan et al., 2002), valdančios ląstelės augimą, proliferaciją, diferenciaciją, baltymų biosintezę, membranineį transportą, branduolio susidarymą, ląstelės griaučių aktino funkcionavimą, apoptozę, (Mittin et al., 2005; Carnoub and Weinberg, 2008). Šie baltymai aptinkami visose eukariotų ląstelėse ir yra labai konservatyvūs. Klonavę *X. laevis* H-Ras baltymo geną ir palyginę su žmogaus H-Ras, nustatėme 98% aminorūgščių homologiją (Valuckaitė ir kt., 2004a). Daugelis Ras baltymų dalyvauja signaliniame kelyje, kuris per transmembraninį receptorių sujungia užląstelinius signalus su citozolio ar branduolio taikiniai (Mittin et al., 2005). Nustatyta daugiau nei 150 mažų G baltymų nuo pirmuonių iki žmogaus. Šiuo metu žinomi 6 didšeimės pošeimiai: Ras, Rab, ARF, Ran, Rho ir Rad/Gen/Kir (Aspenström, 2004).

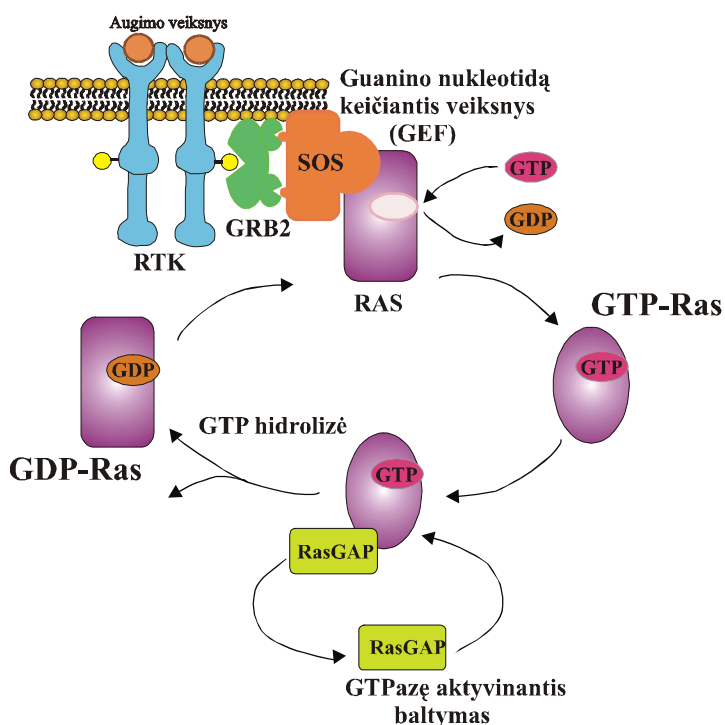
Ras baltymų tyrimai pradėti 1964 m., D. Harvėjui (Jenifer Harvey) aptikus žiurkių sarkomos virusą, gebantį užkrėsti kitus graužikus ir sukelti juose sarkomą (Malumbres and Barbacid, 2003). Šiuo metu Ras baltymų šeima turi daugiau nei 30 narių (Rodrigues-Viciana et al., 2004).

Ras baltymų sąveiką su tolesniais signalinio kelio komponentais (efektoriais) valdo kiti baltymai, užtikrinantys pusiausvyrą tarp GTP (sąveikaujanti su kitais baltymais Ras forma) ir GDP (nesąveikaujanti su kitais baltymais Ras forma) surišusios Ras formos. Įprasta, kad GTP surišusi Ras forma dėl gebėjimo sąveikauti su kitais baltymais laikoma aktyvia, o GDP surišusi Ras forma – neaktyvia (Downward, 2003), bet tai nėra visiškai tikslus Ras baltymų būsenų apibūdinimas. Ras baltymai nuolat turi GTPazinį aktyvumą ir dėl šio aktyvumo nuolat virsta GDP surišusia forma. Tokios formos baltymai sąveikauja su guanino nukleotidą keičiančiu veiksmu GEF ir virsta GTP formos baltymu (2 pav.). Taigi Ras baltymai nuolat keičia savo formą ląstelėje ir todėl yra nuolat (nepriklausomai nuo surišto guanino nukleotido formos) funkcionalūs ląstelėje. GTPazę aktyvinantis baltymas GAP reikšmingai pagreitina Ras gebėjimą hidrolizuoti GTP (Paduch et al., 2001), tuo tarpu GEF baltymas padeda Ras baltymams pakeisti surištą nukleotidą nauju (dažniausiai GTP) nukleotidu (Downward, 2003).

Prijungę GTP, Ras baltymai gali sąveikauti su skirtingais efektoriais. Vis daugėja žinių, liudijančių, kad skirtingos Ras baltymų izoformos turi savo efektorius, nes priklausomai nuo išorinio signalo prigimties, Ras baltymų aktyvinimas gali indukuoti skirtingus signalo

perdavimo kelius (Macaluso et al., 2002). Be to, nustatyta, kad ir patys efektoriai gali būti kelių izoformų, kurios su įvairiais Ras baltymais jungiasi skirtingai (Rodrigues-Viciano *et al.*, 2004).

Ras GTPazės kaip potencialūs progesterono aktyvinamo signalinio kelio, sukeliančio *X. laevis* ovocitų dalijimasi, kandidatai tebėra svarbūs tyrimų objektai (Jesus et al., 1998). Onkogeniniai Ras baltymų mutantai yra nejautrūs GAP baltymams, jie nuolat sąveikauja su efektoriais (McFarlin et al., 2003). Tokių baltymų mikroinjekcijos į ovocitus sukelia ovocitų brendimą ir branduolio apvalkalėlio suirimą – GVBD (angl. *germinal vehicle breakdown*), tačiau pastarasis vyksta lėčiau, nei tuo atveju, kai indukuojamas progesteronu. Manoma, kad Ras sukliamas brendimą skatinančio veiksnio MPF (angl. *M phase promoting factor*, 3 pav.) aktyvinimas pasiekiamas ląstelėje Raf/MEK/MAPK signaliniu keliu (3 pav.).



2 pav. Ras baltymų ciklas ląstelėje (pagal Shubbert et al., 2007)

Iki šiol ovocitų modelinėje sistemoje dažniausiai buvo naudojami onkogeniniai žmogaus Ras baltymai. Lyginant Ras šeimos baltymų aminorūgščių sekas pastebėta, kad pagrindiniai skirtumai yra C-galinėje baltymų srityje (Shubbert et al., 2007). Ši hipervariabili HVR (angl. *hypervariable region*) sritis laikoma svarbia baltymų sąveikai su membrana ir gali turėti įtakos baltymų lokalizacijai ląstelėje. Skirtumai HVR srityje kėlė abejonių, ar *X. laevis* sistemoje naudojami egzogeniniai žmogaus Ras baltymai ovocituose lokalizuojasi teisingai ir lemia fiziologinius efektus (Valuckaitė et al., 2004a). Norėdami įsitikinti, ar Ras iš tikrųjų

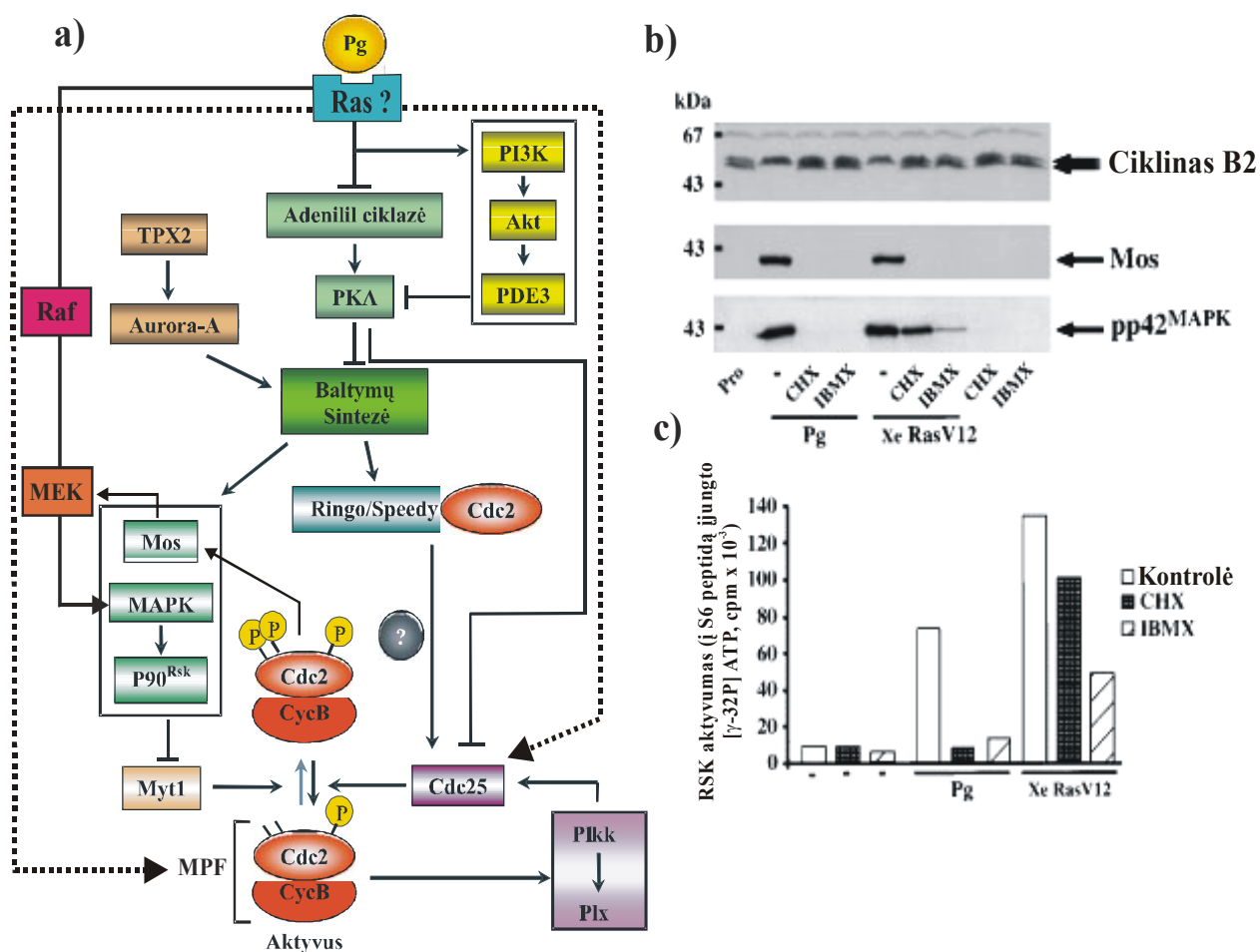
sukelia MPF aktyvinimą minėtuoju signaliniu keliu, tyrimams pasirinkome endogeninius *X. laevis* baltymus.

Klonavę *X. laevis* H-Ras (toliau – Xe H-Ras) geną, nustatėme, kad Xe H-Ras ir žmogaus H-Ras baltymų aminorūgščių homologija siekia 98% (Valuckaitė et al., 2004a). Laboratorijoje sukonstravę, o vėliau išgryninę onkogeninį Xe H-RasV12 baltymą (nuolat aktyvi Ras baltymo forma), mikroinjekcijų ekperimentuose su ovocitais parodėme, kad baltymas aktyvino nuo mitogeno aktyvinamo baltymo (MAP) priklausomą kinazę (MAPK) per Mos sintezę ir per antrinę aktyvintoją, kuriuo gali būti baltymas Raf. Nustatėme, kad GVBD indukcija ovocituose priklauso nuo injekuoto mutantinio Xe H-RasV12 koncentracijos ir kad baltymas, turintis dvigubą mutaciją (Xe H-RasV12/S186), dėl kurios praranda gebėjimą sąveikauti su plazmine membrana, neindukuoja dalijimosi. Tai liudijo, kad onkogeninis H-Ras baltymas gali indukuoti MAPK ir MPF tuo pačiu keliu, kaip ir progesteronas (Dupre, Sužiedėlis et al., 2002).

Xe H-Ras baltymo aktyvumas priklauso nuo palmitoilinimo. Dėl šios modifikacijos Ras baltymas pritvirtinamas prie plazminės membranos (6 pav. a). Taip pat nustatėme, kad MPF aktyvinimas, kurį sukėlė Xe H-RasV12, tik iš dalies priklausė nuo ciklinio AMP (cAMP) ir baltymų sintezės, t.y., priešingai nei indukuojant progesteronu, kai baltymų sintezė yra būtina (3 pav. b-c). Xe H-RasV12 iš dalies indukavo MAPK ir Ribosomos S6 baltymo kinazės (RSK) esant cAMP arba kai baltymų sintezė buvo nuslopinta slopikliu cikloheksimidu. Tai liudijo, kad egzistuoja alternatyvus MAPK aktyvinimo kelias, o visiškai MAPK aktyvumas pasiekiamas vykstant baltymų (pvz. Mos) sintezei ovocituose (Dupre, Sužiedėlis et al., 2002; 3 pav. b-c). Taip pat buvo nustatyta, kad Xe H-RasV12 injekcijomis MPF aktyvinimas pasiekiamas ne vieninteliu keliu, tarp kurių egzistuoja sąveika. Per Mos sintezę arba nesant baltymų sintezės per Raf kinazę pasiekiamas MAPK aktyvinimas baigiasi MPF aktyvinimu, o alternatyviu keliu pasiekiamas (slopinus MEK) MPF aktyvinimas per Mos sintezę aktyvina MAPK (Dupre, Sužiedėlis et al., 2002; 3 pav.). Taigi, nors eksperimentinėmis sąlygomis įmanoma atskirti šiuos kelius (slopinus baltymų sintezę, ar MAPK aktyvinimą, naudojant MEK slopiklius) ir pasiekti MPF aktyvumą ir mejozinį dalijimąsi be MAPK aktyvinimo, fiziologinėmis sąlygomis MAPK aktyvinimas visada baigiasi ir MPF aktyvinimu ir mejozinio ovocitų dalijimusi. Taigi MAPK ir MPF galėtų būti signalinės molekulės, atspindinčios ovocitų pasirengimą mejoziniam dalijimuisi.

Tyrimams panaudoję mutantinius Xe H-RasV12S35, Xe H-RasV12G37 ir Xe H-RasV12C40 baltymus, kurie atrankiai aktyvina atitinkamai Raf/MAPK, RalGDS ir PI3K signalinius kelius (White et al., 1995), parodėme, kad Xe H-Ras sukelia ovocitų brendimą ir

MPF aktyvinimą per naują taikinį, labiausiai tikėtina – kinazę PI3K (4 pav. a-c). Skirtingų Ras baltymų mutantų sąveika su efektoriumi *in vitro* (4 pav. c) atskleidė, kad elektorinių mutantų sąveika gali būti ne tokia specifiška, taigi atlikus papildomus RalGDS ir PI3K slopinimo eksperimentus buvo parodyta, kad ovocituose Xe H-RasV12G37 mutantinis baltymas sąveikauja su PI3K. Visų žinomų Ras signalinių kelių – Raf/MAPK, RalGDS ir PI3K slopinimas neįtakoją progesteronu sukkelto brendimo. todėl tikėtina, kad H-Ras baltymas nėra būtinas fiziologinio induktoriaus (progesterono) sukeltam mejoziniam ovocitų brendimui, nors jo vaidmens šiame procese ir neatmetame (Gaffre et al., 2006).

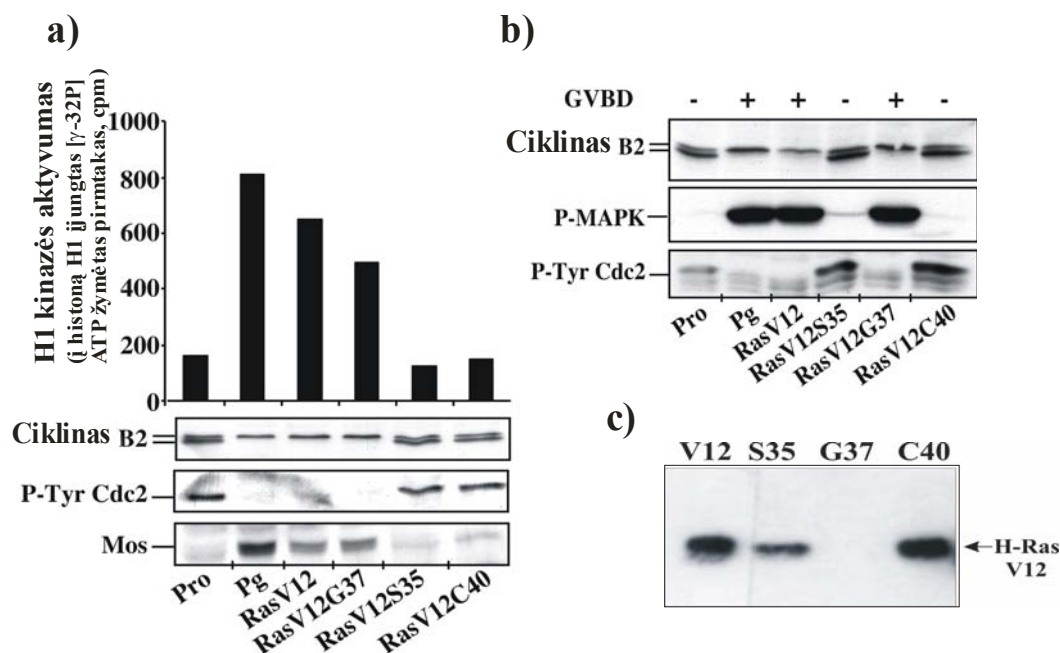


**3 pav. Signalinių kelių aktyvinimo progesteronu ir Ras dalyvavimo jame *X. laevis* ovocituose modelis.** a) – MPF aktyvinimo signaliniai keliai. Punktyrine linija pažymėti alternatyvūs keliai, kuriais Ras aktyvina signalines molekules; b – Ras signalinio kelio komponentų – ciklino B2, Mos, p42<sup>MAPK</sup> aktyvinimas *X. laevis* profazės (Pro) ovocituose. VI stadijos ovocitai inkubuoti tirpale su baltymų sintezės slopikliu cikloheksimidu (CHX) arba 3-izobutil-1 metilksantinu (IBMX). Dar po 1 val. į terpę pripilta progesterono (Pg) arba injekuota RasV12 mutantinio baltymo. Po 18 val. ovocitai homogenizuoti, ekstraktų baltymai tirti PAGE ir imunofermenine analize naudojant antikūnus prieš cikliną B2, Mos, P-MAPK (pp42<sup>MAPK</sup>) baltymus; c – ribosomos S6 baltymo kinazės (RSK) aktyvumas ovocituose, veiktuose progesteronu arba injekavus mutantinį RasV12 baltymą. Ovocitai inkubuoti tirpale su CHX arba IBMX. Po 1 val. pripilta progesterono arba injekuota RasV12 mutantinio baltymo. Po 18 val. ovocitai homogenizuoti, baltymų ekstraktuose nustatytas RSK kinazės aktyvumas (pagal Ferby, 1999; Dupre, Sužiedėlis et al., 2002)



Letalus toksinas (LT) iš bakterijos *Clostridium sordellii* yra gliukoziltransferazė, kuri gliukozilina ir tokiu būdu slopina Ras šeimos baltymus: Ras, Rap ir Rac (Just et al., 1996). LT yra pirmasis nustatytas baltymas, išaktyvinantis Ras baltymus (Just et al., 1996). Parodėme, kad LT injekcija į ovocitus aktyvina MPF kinazę, lemia branduolio apvalkalėlio suirimą ir indukuoja ovocitų mejozinį dalijimąsi. Taigi LT veikia panašiai kaip ir progesteronas, kai yra injekuojamas į visiškai užaugusius (VI stadijos) *X. laevis* ovocitus (Rime et al., 1998).

LT sukeltą ovocitų mejozinį dalijimąsi galima blokuoti padidinus cAMP ir baltymų sintezės slopiklių lygį. Tai įrodo, kad LT šiuo atveju veikia kaip progesteronas (Rime et al., 1998). Eksperimentiškai parodėme, kad ovocitų ekstraktuose LT katalizuoja gliukozės prijungimą prie kelių 23 kDa baltymų ir prie vieno 27kDa baltymo (Rime et al., 1998).



**4 pav. Potencialių signalinių kelių, kuriuose dalyvauja skirtingi Ras efektoriai (Raf, RalGEF, PI3K) tyrimas.** a–b) – Ras signalinių kelių elementų tyrimas *X. laevis* (Pro) ovocituose. Ovocitai inkubuoti terpėje su progesteronu (Pg) arba į juos injekuoti mutantiniai RasV12, RasV12G37, RasV12S35, RasV12C40 rekombinantiniai baltymai. Ovocitai homogenizuoti įvykus branduolio apvalkalėlio suirimui – GVBD („+“) arba po 12 val, jeigu GVBD nevyko („-“). Ekstraktų baltymai tirti PAGE ir imunofermenetine analize naudojant antikūnus prieš cikliną B2, Mos, P-Tyr-Cdc2 baltymus (a) ir P-MAPK (b). H1 kinazės aktyvumas (b) nustatytas pagal  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  įjungimą į histoną H1; c – mutantinių RasV12, RasV12G37, RasV12S35, RasV12C40 rekombinantinių baltymų sąveika su Raf efektoriumi *in vitro*. Ras baltymai sumaišyti su RafRBD-GST baltymu, inkubuota 1 val. Toliau baltymai 2-3 val inkubuoti su glutationo sefrazės dalelėmis, praplauta buferiu. Su dalelėmis susirišę baltymai analizuoti PAGE ir imunofermenetine analize, naudojant antikūnus prieš Ras baltymus (pagal Gaffre et al., 2006).

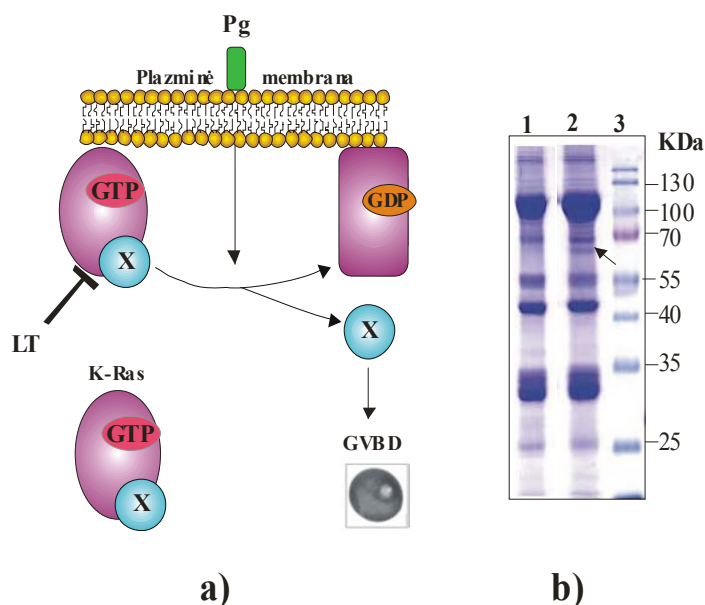
23 kDa baltymai buvo nustatyti naudojant antikūnus prieš Rap1 ir Rap2 baltymus, tuo tarpu 27 kDa baltymas nustatytas naudojant keletą antikūnų prieš Ras baltymus (Rime et al., 1998). LT mikroinjekcijos į ovocitus kartu su radioaktyvią žymę turinčiu fermento substratu (UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]

gliukoze) veikė panašiai kaip ir gliukozilinimas *in vitro*: ovocite *in vivo* gliukozilinimo taikiniai buvo 23 ir 27 kDa baltymai. Kinetiniais tyrimais *in vivo* nustatyta, kad 27 kDa baltymo gliukozilinimas pasibaigė po 2 valandų, kaip tik prieš MPF kinazės aktyvinimą, o 23 kDa baltymai buvo iš dalies gliukozilinami GVBD metu (Rime et al., 1998). Taigi aukščiau aptarti tyrimai parodė, kad 27 kDa Ras baltymas gali būti LT taikiniu *in vivo*, taip sudarant sąlygas aktyvinti MPF kinazę. Įdomu, kad Ras baltymų išaktyvinimas netrukdė c-Raf1 fosforilinimui ir tolesniam MAP kinazės aktyvinimui, kuris vyksta ~ tuo pačiu metu kaip ir GVBD (Rime et al., 1998).

Aukščiau aptarti eksperimentų rezultatai buvo labai netikėti, nes iki tol manyta, kad paveikus ovocitus progesteronu, signalo perdavimo kelyje gali dalyvauti Ras baltymas (3 pav., schema). LT injekcija į ovocitus parodė, kad Ras šeimos baltymo išaktyvinimas, o ne aktyvus baltymas indukuoja mejozinį brendimą. Taigi *Xenopus* ovocituose tarp Ras šeimos baltymų galime tikėtis nustatyti dalijimosi slopiklių, kuriuos išaktyvina LT ir tokiu būdu indukuoja mejozinį ovocitų dalijimąsi. Tokia hipotezė yra drąsi, tačiau atsižvelgiant į Ras šeimos narių funkcijų diversiškumą, galima.

Tarp *X. laevis* Ras baltymų lieka dar vienas kandidatas, galintis būti fiziologinio progesterono kelio komponentu – K-Ras baltymas. Susintetinto ir išgryninto Xe K-Ras L61/S183 baltymo, negalinčio sąveikauti su membrana, injekcijos į ovocitus slopino progesteronu sukeltą brendimą (Valuckaitė et al., 2004b). Toks baltymas pasižymi interferuojančiomis su kitais endogeniniais Ras baltymais savybėmis ir net mejozinį dalijimąsi sukeliančių mutantinių H-Ras baltymų injekcija negali atstatyti MPF aktyvinimo. Šią K-Ras baltymo funkciją būtų galima paaiškinti K-Ras ir atrankaus efektoriaus, svarbaus ir progesteronu indukuojamam ovocitų dalijimuisi, sąveika. Atsižvelgiant į tai, kad gamtinio Xe K-Ras ar GTP formos mutantinio baltymo Xe K-Ras L61 injekcija į ovocitus nesukėlė GVBD ovocituose, galima teigti, kad Xe K-Ras baltymo funkcija ovocituose yra ne aktyvinti, o būtent slopinti mejozinį dalijimąsi.

Efektoriaus, atrankiai sąveikaujančio su K-Ras baltymu, egzistavimas pademonstruotas į ovocitus mikroinjekavus His inkarą turintį rekombinantinį K-Ras baltymą ir vėliau šį baltymą, po sąveikos su efektoriumi išgryninus, pasinaudojus atrankia His inkaro sąveika (5 pav. b, pažymėta rodykle).



**5 pav. K-Ras baltymo vaidmens *Xenopus laevis* ovocitų mejoziniame brendime modelis (a) ir baltymų, atrankiai sąveikaujančių su Ras paieška (b).** Pg – progesteronas, GVBD –branduolio apvalkalėlio suirimas, LT – letalus toksinas iš *C. sordellii*, X – hipotetinis efektorius. 1-2 takeliai – H-Ras L61S186 His<sub>6</sub> (1) ir K-Ras L61S183-His<sub>6</sub> (2) rekombinantiniais baltymais injekuotų ovocitų ekstraktų baltymai, susirišę su Ni<sup>2+</sup> agarozės dalelėmis; 3 takelis – baltymų molekulinės masės žymenys. Į VI stadijos ovocitus injekuota po 1-10 ng baltymo. Praėjus 4 val. po injekcijos, ovocitai homogenizuoti, baltymų ekstraktai sumaišyti su Ni<sup>2+</sup> agarozės dalelėmis, inkubuota 1 val. Nesurišti baltymai nuo agarozės dalelių nuplauti buferiu, turinčiu 50 mM imidazolo. Su dalelėmis susirišę baltymai nuplauti buferiu, turinčiu 100 mM imidazolo. Nuo dalelių nuplauti baltymai analizuoti elektroforeze 10% NDS-PAG.

Tolimesni šio efektoriaus tyrimai ne tik praplės mūsų žinias apie Ras baltymų biologiją, bet taip pat leis siūlyti atrankius įvairių Ras baltymų slopinimo/aktyvinimo būdus, kas savo ruožtu būtų svarbu įvairių patologijų gydymui.

Atlikus mikroinjekcijų į ovocitus eksperimentus su įvairių mutantinių Ras baltymų formomis, remiantis gautais rezultatais, sukūrėme modelį, paaiškinantį K-Ras baltymų vietą progesterono sukeltame mejoziniame *Xenopus* ovocitų brendime (5 pav. a). *X. laevis* ovocitai yra sustoję mejozinio ciklo profazėje I ir nebepratęsia dalijimosi ciklo, kol nėra išorinio stimulo – progesterono. Jei ovocituose per profazę susidaro nedidelis kiekis efektorių, galinčių indukuoti mejozinį brendimą, nors poveikio progesteronu dar nėra, efektoriai turi būti pašalinti. K-Ras baltymai, sąveikaudami su šiais efektoriais, juos pašalina užtikrindami, kad ovocitai nebepratęsia dalijimosi ciklo be progesterono. Dėl progesteronu indukuoto signalo K-Ras baltymai arba išaktyvinami, arba jų kiekis tampa nepakankamu surišti efektoriui, todėl indukuojamas mejozinis brendimas. Tai paaiškintų ankstesnius mūsų eksperimentus su LT ir antikūnais. LT, kuris slopina Ras baltymų sąveiką su efektoriais, blokavo K-Ras baltymų sąveiką su šiuo efektoriumi. Taigi laisvas efektorius ir indukavo ovocitų mejozinį brendimą. K-Ras L61/S183 mutantinis baltymas, kaip ir endogeninis K-Ras baltymas, prijungia efektorius, taigi jis neslopina šios endogeninio baltymo funkcijos, bet kaip ir endogeninis baltymas, pašalina

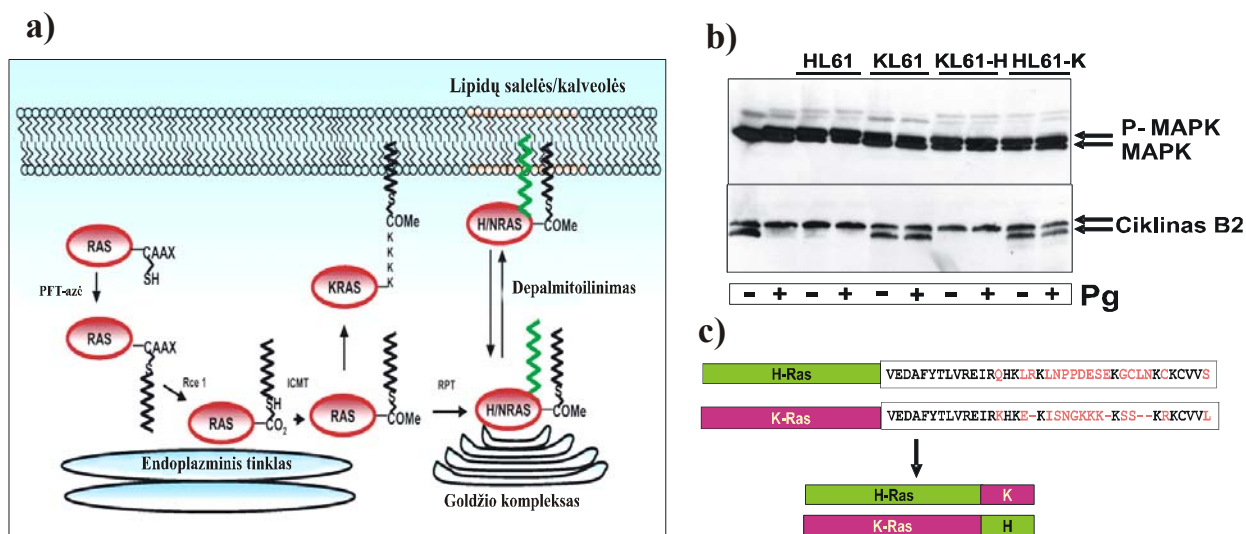
efektorių iš progesterono signalinio kelio, taip slopindamas ovocitų dalijimąsi (5 pav. a), ką parodėme eksperimentiškai.

K-Ras funkcijų *Xenopus laevis* ovocitų mejoziniame dalijimesi tyrimai paliudijo, kokios netikėtos gali būti signalo perdavimo elementų funkcijos, kai plačiai žinomi dalijimosi aktyvintojai – onkogeniniai Ras baltymai gali virsti dalijimosi slopintojais.

Ras baltymo funkcijų mejoziniame brendime tyrimai atskleidė signalines molekules, kurių nustatymas leistų tvirtinti, kad ląstelėje mejozinis dalijimasis įvyks. Tos molekulės yra Mos, MAPK ir MPF. Mos baltymo sintezė yra būtina ir pakankama sąlyga mejoziniam *X. laevis* ovocitų dalijimuisi. Taigi vien Mos baltymo nustatymas leistų tvirtinti apie ląstelės pasidalijimą mejozės būdu. Vis dėlto, kol nėra tiksliai suprasta kaip Mos aktyvina MAPK. Mos pasirinkimas signaline molekule, atspindinčia dalijimąsi, būtų neatsargus. Kitų šiam tikslui naudotinių molekulių MAPK ir MPF nustatymo savaime nepakanka, nes reikėtų įvertinti šių molekulių aktyvinimą (fosforilavimo laipsnį). Aktyvinimui vertinti patogus pasirinkimas – MAPK, nes naudojant antikūnus prieš MAPK, būtų galima įvertinti, kokia MAPK dalis aktyvinta (fosforilinta), o kokia – ne. Taigi *X. laevis* ovocitų progesteronu sukeltame mejoziniame brendime dalyvaujančias signalines molekules galima naudoti būsimo mejozinio dalijimosi patvirtinimui – signalinio kelio elementus galima naudoti išorinio stimulo (progesterono) poveikio įvertinimui.

Pastebėjimai, kad skirtingų Ras baltymų mutacijos nustatomos skirtingų lokalizacijų piktybinių navikų ląstelėse (Karnoub and Weinberg, 2008, apibendrinta Sužiedėlis ir kt., 2008) skatina ieškoti būdų, kuriais būtų galima slopinti individualių Ras baltymų funkcijas. Faktas, kad mejozės slopinimo funkciją gali atlikti būtent K-Ras baltymas ir būtent K-Ras baltymo potransliacinės modifikacijos ir lokalizacijos prie plazminės membranos unikalumas (6 pav. a) (Rajalingam et al. 2007) leidžia tikėtis, kad individualių Ras baltymų slopinimo būdai bus surasti.

Norėdami įvertinti kokį vaidmenį Ras baltymų lokalizacijai ir funkcijoms apsprendžia skirtingos baltymų sritys, sukonstravome hibridinius Ras baltymus, kuriuose C-galinės baltymų dalys iš H-Ras ir K-Ras baltymų buvo sukeistos vietomis (6 pav., c). Injekavę hibridinius baltymus į *X. laevis* ovocitus, nustatėme, kad K-Ras-H baltymas įgijo H-Ras baltymo savybes (6 pav., b), bet H-Ras-K baltymas tik dalinai įgijo K-Ras baltymo funkcijas (šis hibridinis baltymas iš dalies aktyvino MAPK, 6 pav., b). Taigi C-galinė baltymo sritis vaidina labai svarbų vaidmenį Ras baltymų funkcijos, bet efektorinė baltymo sritis taip pat apsprendžia baltymo funkcijas. Tęsdami Ras baltymų funkcijų mejozėje tyrimus, toliau vykdome K-Ras baltymų slopinimo paiešką – K-Ras sąveikos su plazmine membrana modifikacijas.



**6 pav. Ras baltymų potransliacinės modifikacijos ir lokalizacijos prie plazminės membranos skirtumai.** a) – schema, iliustruojanti Ras baltymų potransliacinės modifikacijos ir lokalizaciją ląstelėje. PFT-azė – baltymų farneziltransferazė, Rce 1 – Ras konvertuojantis fermentas 1, ICMT – izoprenilcisteino karboksimetiltransferazė (pagal Rajalingam et al. 2007); b) - Ras signalinių kelių elementų tyrimas *X. laevis* ovocituose įkvėpus mutantinius RasHL61, RasKL61 ir hibridinius RasKL61-H, RasHL61-K baltymus. Po injekcijos ovocitai inkubuoti terpėje su progesteronu (Pg). Ovocitai homogenizuoti įvykus GVBD arba po 12 val, jeigu GVBD nevyko. Ekstraktų baltymai tirti PAGE ir imunofermenine analize naudojant antikūnus prieš cikliną B2 ir MAPK; c) – hibridinių RasHL61-K ir RasKL61-H baltymų konstravimas. C-galinės H-Ras ir K-Rs baltymų sekos, sukeistos tarpusavyje, parodytos vienaraidžiais simboliais.

## 2. Prokariotų signalinių kelių komponentai – bakterijų atsako į rūgštinę aplinkos stresą sistema

Prieš pradėdami eukariotinių ląstelių signaliniuose keliuose dalyvaujančių komponentų tyrimus, iki tol keletą metų tyrėme prokariotinių organizmų adaptacinių atsakų molekulinės sistemas. Gauti rezultatai leidžia teigti, kad molekulinės sistemos, dalyvaujančios prokariotinės ląstelės atsake į konkretų aplinkos signalą, gali būti pakankamai sudėtingos.

Bakterijos yra vieni gausiausių organizmų biosferoje, egzistuojantys joje milijardus metų. Iki mūsų dienų išlikti nuolat besikeičiančios aplinkos sąlygomis sugebėjo tie mikroorganizmai, kurie evoliucinės raidos metu įgijo aukščiausią adaptacijos kintančioje aplinkoje potencialą. Neabejotinai mikroorganizmams adaptuotis prie daugybės aplinkos pokyčių labai svarbūs yra aplinkos jutikliai ir greitą viduląstelinį atsaką užtikrinančios sistemos. Taigi mikroorganizmų adaptacijos kintančioje aplinkoje sistemos yra puikus signalinių elementų tyrimo modelis.

Nustačius, kokių signalinių molekulių egzistavimas bakterijų ląstelėse susijęs su vienokiu ar kitokiu bakterijų atsparumu rūgščiai aplinkai, būtų galima sukurti veiksmingesnes infekcijų kontrolės strategijas, taigi tokio „įrankio“ naudojimas turėtų ir taikomąją vertę. Atsižvelgiant į tai, kad bakterijos yra paprastas modelinis organizmas, enterobakterijų atsako į rūgštinį stresą tyrimai yra puiki galimybė nustatyti, ar signalinių elementų apibūdinimas tam tikru laiku

momentu suteikia pakankamai informacijos apie viso organizmo prisitaikymą prie aplinkos tuo metu.

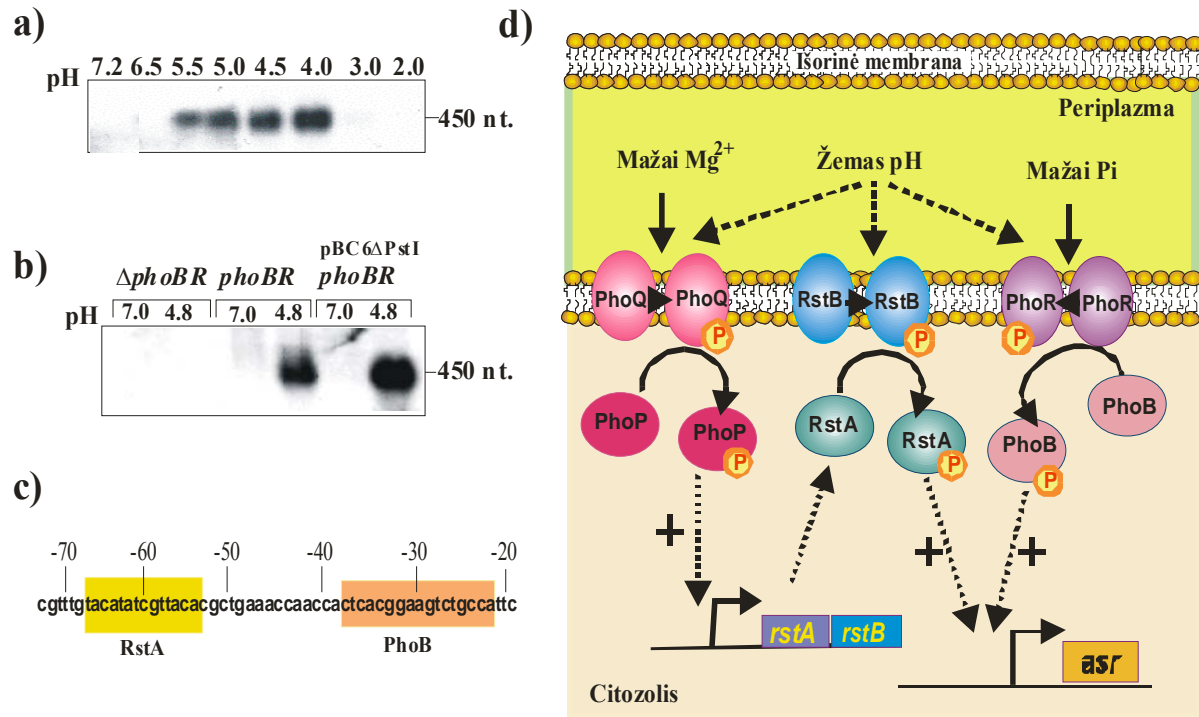
Tyrėme enterobakterijų (*Enterobacteriaceae*) šeimos bakterijų molekulinės sistemos, dalyvaujančias atsake į žemą aplinkos pH – itin dažnai sutinkamą stresinį veiksnį. Enterobakterijų šeimos (ją sudaro daugiau nei 24 gentys, per 170 rūšių) atstovų gyvenamoji aplinka yra šiltakraujų žinduolių žarnynas, antrinė – nuotekų vandenys, dirvožemis, daugybė kitų gamtinių nišų. Enterobakterijos kolonizuoja žmogaus ir gyvūnų žarnyną, o patogeniškos rūšys – sukelia infekcijas tik išgyvenę ypač rūgščioje skrandžio aplinkoje (pH 1.0-2.0). Viduląstelinis patogenus (pvz., patogeniškų *Salmonella enterica* serotipų bakterijas) rūgštinis stresas veikia eukariotų fagocituojančių ląstelių vakuolėse (pH 4.0-5.0).

Enterobakterijų atsako ir adaptacijos rūgštiniam stresui molekuliniai mechanizmai yra labai sudėtingi. Juose dalyvaujančių genų veikla valdoma pasitelkiant visus įmanomus genų raiškos valdymo būdus ir hierarchinius lygmenis (Rychlic and Barrow, 2005), liudijančius atsako į šį aplinkos stresą svarbą. Visuminiais genų raiškos ir baltymų tyrimų metodais nustatyta, kad molekuliniai komponentai, dalyvaujantys atsake į rūgštinį stresą, funkcionuoja visoje ląstelės erdvėje nuo išorinės membranos iki bakterijos nukleoido, daugelis jų sintetunami naujai (Tucker et al., 2002, Yohannes et al., 2004). Tačiau menkai žinoma, kokios ląstelinės sistemos dalyvauja perduodant signalą apie žemą aplinkos pH į ląstelės vidų.

Tirdami *Escherichia coli* ir kitų enterobakterijų (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* gentys) bakterijų atsaką į rūgštinę aplinkos stresą nustatėme, kad žemas aplinkos pH (pH<5.0) labai veiksmingai aktyvina *asr* geno raišką greitai augančiose (logaritminės fazės) ląstelėse (7 pav. a). Geno transkripcinis atsakas enterobakterijose priklausė nuo augimo terpės pH (Sužiedėlienė, Sužiedėlis et al., 1999; Šeputienė et al., 2003; Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2004). Visuminiu genų raiškos tyrimu nustatėme, kad jis yra didžiausias visame *E. coli* genome, (Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2005). Silpnos organinės rūgštys, kurios dėl aukštesnio citozolio pH, jame disocijuoja ir taip atrankiai sumažina tik citozolio pH, neaktyvino geno raiškos (Sužiedėlienė, Sužiedėlis et al., 1999). Tai liudijo, kad nustatėme bakterijos transkripcinį atsaką į signalą, veikiantį ne citozolyje, bet ląstelės išorėje arba periplazmoje, iš kur jis, greičiausiai, perduodamas signaliniu keliu. Labai veiksmingas vieno *asr* geno transkripcijos atsakas viso bakterijos genomo kontekste liudijo, kad atsakui būdingas didelis savitumas. Didelė tikimybė, kad juntamu signalu galėtų būti H<sup>+</sup> jonai, pakliūnantys per išorinę membraną į periplazmą.

Atlikę komponentų, dalyvaujančių signaliniame kelyje paiešką, nustatėme, kad žemo pH aktyvinamai *asr* geno raiškai yra būtina funkcionali *E. coli* dvinarė baltymų sistema PhoB-

PhoR. Sistemos baltymus koduojančių genų iškrita chromosomoje panaikino *E. coli* savitą atsaką į rūgštinį stresą, o plazmidėje įterpta operono kopija jį sustiprino (7 pav. b) (Sužiedėlienė, Sužiedėlis et al., 1999)



7 pav. *Escherichia coli* signalinio kelio, aktyvinančio rūgštinio streso atsako *asr* geną, elementų tyrimas ir hipotetinis modelis. a) – *E. coli asr* geno raiškos priklausomybė nuo augimo terpės pH. Bakterijos (MC4100) augintos LPM terpėje, pH 7.0 iki  $A_{590}=0.5$ . Sumažinus terpės pH, ląstelės inkubuotos 2 val. Išskirta visa ląstelės RNR, *asr* iRNR (450 nt.) tirta Northern metodu naudojant  $P^{32}$  izotopą turintį savitą DNR fragmentą; b) – *E. coli asr* geno raiškos priklausomybė nuo veiklios dvinarės signalo perdavimo sistemos *phoBR*. *E. coli* ANCK10 (*phoBR*), ANCH1 (*ΔphoBR*), ANK10 su plazmide pBC6ΔPstI *phoBR* kameinų ląstelės augintos kaip aprašyta b dalyje; c) – *E. coli asr* geno promotoriaus sritys (nuspalvintos), nustatytos mutacijomis ir DNR/baltymų sąryšos metodu, svarbios nuo žemo aplinkos pH priklausomai geno transkripcijai aktyvinti; d) – signalo apie žemą aplinkos pH perdavime ir atsako geno (*asr*) aktyvinime dalyvaujančių komponentų hipotetinė schema (pagal Sužiedėlienė, Sužiedėlis et al., 1999, Šeputienė et al., 2003; Ogasawara et al., 2007; Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2004).

PhoB-PhoR yra *E. coli* signalo perdavimo sistema, kurią sudaro vieno operono koduojami baltymai. Baltymų sintezė išauga fosfato bado sąlygomis. Baltymas reguliatorius PhoB aktyvina *pho* grupės genų, kurių produktai užtikrina fosfato pasisavinimą bado sąlygomis, raišką, atrankiai prisijungdamas prie savitos 18 n.p. *pho* srities genų promotoriuose (Lamarche et al., 2008). *E. coli asr* geno promotoriuje nustatėme sritį, pasižyminčią dideliu panašumu į PhoB baltymo taikinių promotorių tipišką *pho* seką (7 pav., c) ir parodėme, kad baltymas atrankiai sąveikauja su šios srities DNR (Sužiedėlienė, Sužiedėlis et al., 1999). Tai liudijo, kad PhoB-PhoR dvinarė sistema yra signalo apie žemą aplinkos pH perdavimo kelio dalyvis.

Signalų perdavimas dvinarėmis baltymų sistemomis (angl. *two component systems*) yra vienas iš dažniausiai bakterijų pasitelkiamų būdų reaguoti, atsakyti ir prisitaikyti prie kintančių aplinkos sąlygų. Jos laikomos funkciniais eukariotų signalo perdavimo sistemų prototipais. Tipinę dvinarę baltymų sistemą sudaro membranoje esantis baltymas jutiklis – histidino kinazė, atsakydama į stimulą, katalizuoja savo autofosforilinimą ir kinazės taikynys – fosforilinas baltymas atsako reguliatorius. Fosforilinti baltymai reguliatoriai keičia bakterinės ląstelės fiziologiją, dažniausiai valdydami tam tikrų genų ar genų grupių raišką – tokiu būdu pasireiškia atsakas į poveikį (Laub and Goulan, 2007).

*E. coli* PhoB-PhoR dvinarės sistemos jutiklis yra dimerinė plazminės membranos histidino kinazė PhoR, kuri, manoma, sąveikauja su fosfato transporto sistemos komponentais ir yra aktyvinama, kai periplazmoje ortofosfato (pi) koncentracija yra maža (<4 μM). Kiti signalai, tiesiogiai ar netiesiogiai aktyvinantys PhoR, nėra žinomi, nors PhoB-PhoR sistemos svarba pademonstruota ir kitų atsakų į aplinkos pokyčius tyrimuose, tarp jų ir reikšmė bakterijų patogenizei (Lamarche et al., 2008). Tirdami PhoB-PhoR sistemos vaidmenį bakterijų rūgštinio streso atsake nustatėme, kad fosfato koncentracija tik nežymiai įtakojo žemo pH indukuojamą *asr* geno transkripciją, taigi, bazinės PhoB-PhoR sistemos raiškos pakako užtikrinti žemo pH signalo aktyvinamą atsako geno raišką, tačiau ji, greičiausiai, stiprinama kitų signalo perdavime dalyvaujančių komponentų. Pasiūlėme, kad egzistuoja kiti pH signalinio kelio komponentai, kartu su PhoB-PhoR sistema dalyvaujantys geno raiškos valdyme (Sužiedėlienė, Sužiedėlis et al., 1999).

Lyginamąja enterobakterijų *asr* genų promotorių analize parodėme, kad genų promotorių –70/-40 sritys pasižymi didele homologija. Mutageneze nustatėme, kad ~ 15 nt. srities apie -60 padėtį (-67/-54) mutacijos didžiausiu laipsniu slopino žemo pH aktyvinamą geno raišką (Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2004). Pasiūlėme, kad ši sritis gali būti kito baltymo, dalyvaujančio signalo perdavime, taikynys (Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2004). 2007 m. Ogasawara ir bendradarbiai parodė, kad su sritimi atrankiai sąveikauja dvinarės RstA-RstB sistemos baltymas reguliatorius RstA, o funkcionali sistema taip pat yra būtina nuo žemo pH priklausomai geno raiškai aktyvinti (Ogasawara et al., 2007). *E. coli asr* genas yra vienas pirmųjų nustatytų šios sistemos taikinių. Signalas, aktyvinantis, RstAB histidino kinazę RstB, kol kas nėra žinomas. Tai, kad *E. coli asr* geno promotoriaus sritis, prie kurios atrankiai jungiasi baltymas reguliatorius RstA, tarp enterobakterijų pasižymi didele homologija (Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2004), ir kad enterobakterijose nustatyti RstA-RstB dvinarės baltymų sistemos homologai liudija, kad RstA-RstB yra konservatyvus signalo perdavimo apie žemą aplinkos pH sistemos elementas. Įdomu, kad RstA-RstB sistemos genų raišką, savo



ruožtu, aktyvina dar viena dvinarė baltymų sistema PhoQ-PhoP. Šią sistemą aktyvinantis signalas yra žinomas - katijonų, pvz.,  $Mg^{2+}$  koncentracijos pokyčiai aplinkoje. Tam tikrose enterobakterijose (*Salmonella*) PhoQ-PhoP sistema valdo patogenezei svarbių genų raišką, perduodama signalus apie aplinkos pokyčius, tarp jų, manoma ir pH, šeimininko organizme. Remiantis katijonų sąveikos su membranos jutikliu PhoQ modeliu, pasiūlytu Cho ir bendradarbių. (Cho et al., 2006), PhoQ-PhoP sistemos jutiklis PhoQ galėtų būti ir  $H^+$  jonų periplazmoje jutikliu signalo perdavimo kelyje, aktyvinančiu PhoP, kuris savo ruožtu, aktyvina RstA-RstB sistemos raišką (7 pav. d). Tai, kad nesant funkcionalios PhoQ-PhoP sistemos, *E. coli* žemo pH aktyvinama *asr* geno transkripcija vis dėlto vyksta, tik mažesniu veiksmingumu (Ogasawara et al., 2007), liudytų, kad  $H^+$  jutiklio funkciją galėtų atlikti ir RstB kinazė, toliau, savo ruožtu, aktyvinanti RstA baltymą reguliatorių. Apibendrinant galimą signalo apie žemą aplinkos pH perdavimo į bakterijų citozolį kelio modelį, PhoQ-PhoP, RstA-RstB ir PhoQ-PhoP dvinarės baltymų sistemos galėtų dalyvauti perduodant signalą apie žemą aplinkos pH, labai veiksmingai aktyvindamos atsako geno (*asr*) raišką. PhoQ-PhoP ir PhoB-PhoR sistemų dalyvavimas galėtų sustiprinti atsaką į žemą aplinkos pH aplinkoje esant ir kitų signalinių molekulių, aktyvinančių šių sistemų membranines kinazes. *E. coli* pavyzdžiu parodėme, kad atsako geno koduojamas baltymas svarbus bakterijų augimui ir išgyvenimui sumažėjus aplinkos pH iki 4.5 (Šeputienė, Sužiedėlis et al., 2003). Taip pat parodėme, kad atsako metu aktyvinami ir kiti ląstelės komponentai, keičiasi membranų savybės (Šeputienė et al., 2006; Armalytė et al., 2004a, Armalytė et al., 2004b).

Remiantis aukščiau apibendrintu modeliu, bakterijų atsako į žemą aplinkos pH signalo perdavimo molekulinį vyksmų, užtikrinančių greitą ląstelės atsaką, lemiantį išgyvenimą pakitusioje aplinkoje, seka yra:

- Išorinio signalo apie žemą pH perdavimas į ląstelės vidų per išorinę bei plazminę membranas ir jas skiriančią periplazmą dalyvaujant dvinarėms baltymų sistemoms;
- Genų raišką valdančių baltymų sintezė ir/ar aktyvinimas;
- Savitųjų streso atsako genų ir/ar genų grupių transkripcijos aktyvinimas;
- Savitųjų baltymų bei fermentų, užtikrinančių svarbiausių sistemų funkcionavimą, streso sukeltų makromolekulių pažeidimų taisymą ir veikiančių visuose ląstelės erdvės skyriuose, *de novo* sintezė.

Išvardinti molekuliniai vyksmai nustatyti enterobakterijose, kuomet jos patenka į rūgščių aplinką atitinka klasikinę signalo perdavimo kelio sampratą, kai išorės poveikį pajunta jutikliai, o reakcijos į poveikį rezultatas – sistemų reguliuojančių viduląstelinį pH ir mažinančių žemo pH sukeltus padarinius aktyvinimas. Tikėtina, kad, nustačius visą molekulinį vyksmų

enterobakterijose rūgštinio streso sąlygomis seką, signalinių molekulių analizę būtų galima naudoti ir streso sukeltų padarinių bakterijoms ir jų prisitaikymą stresui vertinti.

### **3. Sutrikusių funkcijų (vėžinių) ląstelių atsako į taikomą terapiją vertinimas**

XX-ojo amžiaus antroje pusėje nustacius molekulinis ląstelių komponentus atsakingus už vėžio vystymąsi gimė didžiulė viltis įveikti šiuos susirgimus. Deja, šiandien aišku, kad vėžio vystymąsi lemiančių priežasčių išaiškinimas ne visuomet atsako, koks gydymo būdas kiekvienam pacientui veiksmingiausias. Taigi būtina tirti ne tik ląstelės transformaciją ir jos savybes po transformacijos lemiančius molekulinis veiksnis, bet taip pat įvertinti kaip pakitusios ir dėl to transformuotos ląstelės reaguos į terapinį poveikį. Kitaip tariant, būtina įvertinti kaip universalūs signaliniai elementai, aktyvinami pvz. pažeidus ląstelės DNR dėl pacientui taikomos vėžio terapijos, atskleidžia sutrikusių (vėžinių) ląstelių reakciją į terapiją. Anksčiau nagrinėtuose signaliniuose keliuose pavyko nustatyti signalines molekules, atspindinčias ląstelių atsaką į aplinkos poveikį ir tai paskatino mus ieškoti signalinių molekulių, atspindinčių vėžinių ląstelių reakciją į terapinį poveikį. Šioje dalyje nagrinėjami skirtingų veiksmų, lemiančių vėžinių ląstelių savybes ir įtakojančių ląstelių atsako į terapinį poveikį įvertinimą, tyrimai. Taip pat pristatoma modelinė ląstelių atsako į spindulinę terapiją tyrimo sistema.

1970 m. buvo nustatytas pirmasis žmogaus onkogeninis virusas – Epšteino-Baro virusas, sukeliantis retą piktybinį naviką. Žmogaus papilomos virusas (ŽPV) - dar vieno viruso, įtakojančio malignizacijos procesą, pavyzdys. ŽPV replikacijos ciklas prasideda virusui patekus į epitelio bazinio sluoksnio ląsteles. Virusui patekus į ląstelę, jo DNR ne iškart integruojasi į šeimininko ląstelės genomą ir replikuojama neintensyviai (vieną kartą per ląstelės dalijimosi ciklą) tol, kol vyksta bazinio sluoksnio ląstelės diferenciacija į paviršinio sluoksnio ląstelę (Flores and Lambert, 1997). Diferencijuotuose keratinocituose ŽPV DNR daugybę kartų replikuojama “besisukančio rato” principu, sintetinami kapsidės baltymai ir susidaro viruso dalelės. ŽPV genomus koduoja tik apie 10 baltymų, todėl ŽPV savo transkripcijai ir replikacijai naudoja ląstelės šeimininkės molekulinis elementus, kurie sąveikauja su viruso genomo reguliaciniu regionu (LCR) ir inicijuoja viruso E6 ir E7 genų transkripciją. E6 ir E7 genų produktai sutrikdo ląstelės šeimininkės dalijimosi ciklo kontrolę, jungdamiesi su įvairiais baltymais - vėžio slopintojais, cikliniais ir nuo ciklinų priklausomomis baltymų kinazėmis. E6 ir E7 genų produktų funkcija – pakeisti diferencijuotą ir nustojusią dalytis ląstelę į produktyvios viruso replikacijos aparatą, todėl E6 ir E7 genų produktai, sąveikaudami su infekuotos ląstelės

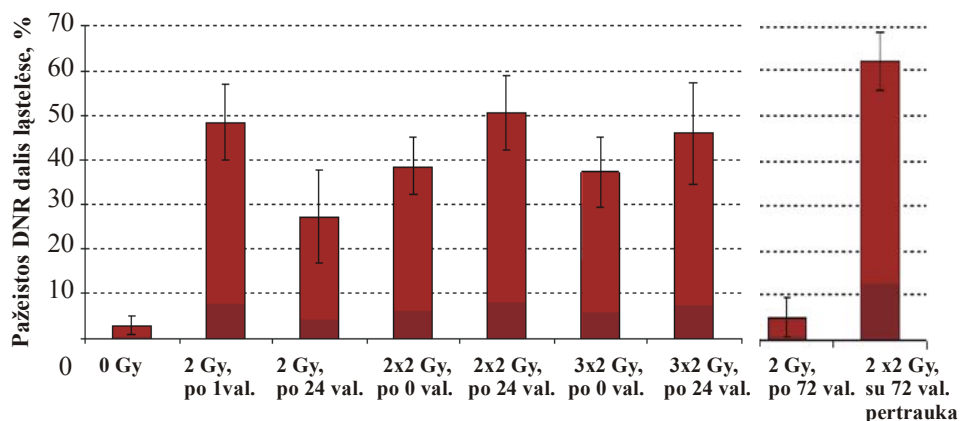
molekuliniais elementais, grąžina ją į dalijimosi ciklą. Neabejotina, kad ląstelės dalijimosi (proliferacijos) intensyvumas įtakos ir ląstelės jautrumą spindulinei ar chemoterapijai. Pažymėtina, kad nustatyta daugiau kaip 120 viruso tipų, kurie skiriasi savo gebėjimu transformuoti ląsteles (Zur Hausen H., 2000). Didžiausią pogrupį sudaro gleivines infekuojančių tipų virusai. Apie dvidešimt ŽPV tipų yra susiję su gimdos kaklelio vėžiu. Šio pogrupio ŽPV pagal onkogeniškumą skirstomi į mažos ir didelės vėžio rizikos virusų tipus Milde-Langosch et al., 2000). Kol kas nėra tiksliai nustatyta ar didelės vėžio rizikos ŽPV tipo virusai dažniau inicijuoja malignizacijos procesą ar stipriau paskatina dėl kitų priežasčių prasidėjusį procesą. Vis dėlto, tiek terapijos parinkimui, tiek navikinių ląstelių atsako į terapiją vertinimo tyrimams svarbu nustatyti, ar naviko ląstelės yra infekuotos ŽPV ir jo tipą. Ištyrus gimdos kaklelio vėžiu sergančias ir sveikas moteris Lietuvoje nustatyta, kad daugiau nei pusė sergančių moterų infekuotos didelės rizikos ŽPV tipų virusais (Gudlevičienė et al., 2005), todėl vertinant ląstelės reakcijos į terapinį poveikį apibūdinimą, remiantis signalinėmis molekulėmis, būtina atsižvelgti ir į ląstelės infekcijos ŽPV statusą.

Matrikso metaloproteinazės MMP – proteolitiniai fermentai, išskiriami navikinių ląstelių. Ląstelės turi prasiskverbti per barjerus, trukdančius joms plisti. Tokie barjerai – tai bazinės membranos bei užląstelinis matriksas, kuriuos ir padeda įveikti matrikso metaloproteinazės. Taigi šių fermentų raiška tiesiogiai susijusi su navikinių ląstelių plitimu – navikinio proceso progresavimu. Diskutuojama, ar MMP atlieka signalinių molekulių vaidmenį angiogenezės procese (Sternlicht and Werb, 2001). MMP priskiriamas tiesioginis vaidmuo angiogenezės procese, plintant kraujagyslių ląstelėms. Tiek angiogenezė, tiek navikinių ląstelių plitimas - neatsiejami navikinio proceso progresijos veiksniai, įtakojami MMP raiškos, todėl MMP raiškos tyrimas tiek naviko ląstelėse, tiek pacientų kraujyje yra vertingas naviko invazyvumo apibūdinimo metodas. Terapinio poveikio veiksmingumas pacientams, pasižymintiems skirtingo invazyvumo navikų ląstelėmis, bus skirtingas, todėl navikų invazyvumo įvertinimas – svarbi atsako į terapinį poveikį vertinimo dalis. MMP-9 raiškos patvirtinimas beveik visuose tirtuose šlapimo pūslės pacientų kraujo mėginiuose, ir neigiamas MMP-3 raiškos tyrimo rezultatas (Stančiūtė et al, 2007) rodo, kad pasirinkus kelių MMP spektrą, galima apibūdinti navikų invazyvumą ir tai gali padėti vertinti navikinių ląstelių reakciją į taikomą terapiją.

Navikinio proceso progresavimas susijęs ne tik su genetiniais bet ir su epigenetiniais pokyčiais. Epigenetinių pažeidimų – vėžio vystymąsi įtakojančių genų promotorių hipermetilinimas nustatytas įvairių lokalizacijų navikuose (Esteller 2003). Taigi kitas navikų invazyvumo vertinimo metodas – genų promotorių metilinimo laipsnio nustatymas.

Bendradarbiaujant su VU mokslininkais atliktas epigenetinių pokyčių tyrimas šlapimo pūslės navikų ląstelėse atskleidė, kad genas *RASSF1A* dažniau hipermetilintas vėlesnių stadijų navikuose, taip pat šio geno hipermetilimas susijęs su navikų invazyvumu (Jarmalaitė et. al., 2008). Taigi epigenetinių pokyčių naviko ląstelėse įvertinimas taip pat gali padėti norint tiksliau apibūdinti navikinių ląstelių reakciją į pacientams taikomą terapiją.

Nors vis dažniau klinikiniuose tyrimuose vėžio terapijoje naudojami taikinių terapijos preparatai, kasdieninėje klinikinėje praktikoje dažniausiai taikomos vėžio terapijos formos – spindulinė ir chemoterapija. Ląstelėse funkcionuoja DNR pažeidų reparacijos sistemos, todėl kyla klausimas, ar pirmoji spindulinės terapijos bei chemoterapijos dozė neaktyvina šios sistemos ir ar dėl to nekinta ląstelių jautrumas vėlesnėms terapijos dozėms? Modelinėje sistemoje kelis kartus švitinome eksperimentiniuose gyvūnuose išaugintus navikus tokio pat dydžio dozė ir vertinome jų jautrumą (8 pav.). Nustatėme, kad būtent pirmajai apšvitos dozei navikai yra jautriausi. Taip pat nustatėme, kad praėjus 72 valandoms po švitinimo, naviko ląstelių jautrumas švitinimui vėl tampa didžiausias (8 pav.).



**8 pav. DNR pažeidos, nustatytos Liuiso plaučių vėžio ląstelių linijos (LLC) ląstelėse po poveikio skirtingo frakcionavimo 2-6 Gy apšvita.** LLC ląstelės injekuotos į eksperimentinio gyvūno (pelė) poodinį sluoksnį. Išaugę navikai išimti chirurginiu būdu, homogenizuoti, vienodus skaičius ląstelių injekuotas į reikalingą eksperimentui gyvūnų skaičių. Po 2 savaičių navikai veikti 2-6 Gy gama spinduliuote pagal nurodytą schemą po 2 Gy kas 24 val arba po 2 Gy kas 72 val. Po apšvitos, DNR pažeidos vertinamos tą pačią dieną arba po 24 val. DNR pažeidoms nustatyti eksperimentiniai gyvūnai paaukoti, navikai išimti, homogenizuoti, DNR pažeidos vertintos kometų metodu. Pateikti trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkiai.

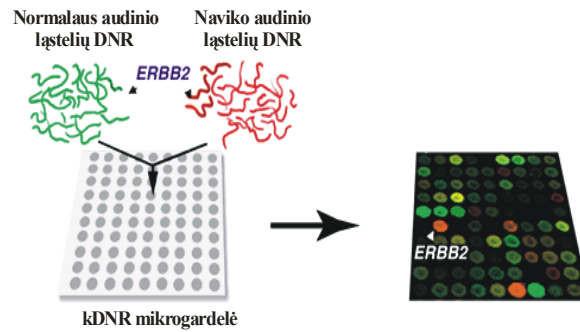
Pasirinktoje modelinėje sistemoje ląstelių jautrumas kinta, todėl modelinė sistema gali būti naudojama nustatyti signalinių kelių elementus, tinkamus ląstelių jautrumo pasirinktu momentu vertinimui. DNR pažeidų sistema – intensyviai tiriama ląstelės apsauginė sistema, kurioje nustatyta per 50 komponentų (Niida and Nakanishi, 2006). Taigi, naudoti DNR pažeidų sistemos signalinius elementus norint įvertinti kokiu jautrumu švitinimui pasižymi vėžinės

ląstelės, nebūtų paprasta. Verta atkreipti dėmesį, kad vienas šios sistemos komponentų yra baltymas p53. Atsižvelgiant į šio baltymo daugiafunkciškumą ir dažnas jo mutacijas vėžinėse ląstelėse, pasirinkimas, kurie sistemos signalinio kelio komponentai patikimai atspindėtų vėžinių ląstelių jautrumą tolimesnei apšvitai po patirtos apšvitos – sudėtingas uždavinys, kurio lengviausias sprendimo būdas – atsisakymas jį spręsti, naudojant kokybiškai naujus pogenominių tyrimų metodus.

#### **4. Signalinių kelių komponentų tyrimai pogenominėje eroje – kokybiškai naujas tyrimų etapas**

Informacija, kaupu apie žmogaus genomą per Žmogaus genomo projekto vykdymo laikotarpį, leido tobulinti lyginamąją genomų hibridizacijos (angl. *comparative genome hybridisation, CGH*) technologiją ir kurti DNR gardeles ne iš gamtinių chromosomų, bet iš žinomos sekos genomo fragmentų. Tokių fragmentų šaltiniu DNR mikrogardelių kūrimui panaudotos BAC bibliotekos (Solinas-Toldo et al., 1997, Pinkel et al., 1998), bet tokios DNR mikrogardelės reprezentavo tik nedidelę žmogaus genomo dalį. Kitas DNR fragmentų šaltinis – kDNR (kopijinė DNR) bibliotekos. Šis DNR fragmentų šaltinis taip pat buvo naudojamas DNR mikrogardelių kūrimui. kDNR mikrogardelės pirmiausia buvo naudojamos ne genomo dalių kopijų skaičiaus analizei, bet genų raiškos tyrimams (Schena et al. 1995, DeRisi, 1996). Sukaupta 30000 žmogaus genų kDNR biblioteka (Delsukas et al., 1998) pakankamai tolygiai reprezentavo visą žmogaus genomą, todėl pasiūlyta ją panaudoti DNR mikrogardelių, skirtų genomo dalių kopijų skaičiaus analizei, gamybai. Prielaidos, kad tokia DNR mikrogardelė patikimai atskleidžia viso žmogaus genomo dalių kopijų skaičiaus pokyčius, buvo patvirtintos naudojant genomine ląstelių kultūrų DNR, kurios pokyčiai buvo žinomi (Pollack. et al., 1999). Nuo tada kDNR bibliotekos (ar genų fragmentų oligonukleotidai) plačiai naudojami DNR mikrogardelių technologijoje (9 pav.).

Palyginę klasikinę CGH ir a-CGH, naudojant mikrogardes (a-CGH, array-CGH), pastebėjome, kad vienintelis šių technologijų skirtumas – mikrogardelė, bet šis skirtumas labai padidino metodo jautrumą ir net vienintelio geno kopijų skaičiaus pokyčiai tapo pastebimi. Šis



9 pav. Lyginamosios genomų hibridizacijos naudojant DNR mikrogardelių technologiją principinė schema

technologinis patobulinimas tapo įmanomas dėl Žmogaus genomo projekto, taip pat dėl kitų organizmų genomų projektų rezultatų. Šis technologinis patobulinimas, dėl jo padidėjęs CGH technologijos jautrumas bei mikrogardelių naudojimas genų raiškos analizei biologijos, biomedicinos mokslų vystymuisi atvėrė kokybiškai naują etapą, pavadintą Pogenomine era. Taigi dabartinį etapą biologijoje pagrįstai vadiname Pogenomine era ne todėl, kad buvo baigti Žmogaus genomo ir kitų organizmų genomų projektai, bet todėl, kad šių projektų rezultatai leido sukurti technologijas labai paspartinusias biologijos vystymąsi. Padidėjęs CGH technologijos jautrumas, kai vieno tyrimo metu galima tirti ne tik viso organizmo genų veiklą, bet ir analizuoti kiekvieno geno raišką, leido tyrėjams atsisakyti hipotezių tikrinimo tyrimų ir vykdyti žvalgomuosius tyrimus. Visa tai labai padidino tyrimų veiksmingumą.

Būtina visuminių tyrimų infrastruktūros dalis – biologinių ėminių ir informacijos apie juos saugykla – biobankas (Stančiūtė ir kt., 2008). Vilniaus universiteto Onkologijos institute jau ne pirmi metai kaupiami į klinikinius tyrimus įtrauktų pacientų ėminiai. Kitas biobanko plėtros etapas – sisteminis (ne tik į specifinius tyrimus įtrauktų pacientų ėminių) biobanko kaupimas.

VUOI taip pat funkcionuoja DNR mikrogardelių technologijos infrastruktūra, kurios pagalba tyrimuose galima naudoti tiek komercines tiek pačių tyrėjų Lietuvoje pagamintas DNR mikrogardeles. DNR mikrogardelių technologija - ne vienintelė Lietuvos tyrėjams jau prieinama visuminio tyrimo technologija. Lietuvoje taip pat vystoma proteominių tyrimų infrastruktūra, kurios pagrindinis padalinys – Proteomikos centras įsteigtas Biochemijos institute, o su šiuo centru susijusių laboratorijų-terminalų yra įvairiose Lietuvos mokslo institucijose (tarp jų ir VUOI).

Dar viena perspektyvi tiek technologiniu požiūriu, tiek ir tyrimų sritis yra miRNR ir siRNR naudojimas (Vidugirienė et al, 2007).

## **Perspektyvos**

Tikėtina, kad Lietuvoje sukurta ir tobulinama visuminių tyrimų infrastruktūra leis atlikti visuminį signalinių komponentų kiekio ir būvio koreliacijos su ląstelių jautrumu spindulinės ar chemoterapijos poveikiui nustatymą, taip pat kitus klinikinius tyrimus, kurių tikslas - koreguoti (individualizuoti) onkologinių pacientų gydymo taktiką terapijos metu, vertinant terapijos veiksmingumą pagal naviko/organizmo ląstelių signalines molekules. Tokie tyrimai jau vykdomi bendradarbiaujant VUOI, VU ir BcHI mokslininkams, naudojant esamą tyrimų infrastruktūrą ir apžvelgtuose tyrimuose sukurtas modelines sistemas.

## **Išvados**

1. MAPK – universalus Ras aktyvinamo ląstelių dalijimosi signalinio kelio komponentas, pagal kurio fosforilinimo laipsnį galima spręsti apie ląstelių aktyvinimą dalijimuisi;
2. *asr* RNR – universalus enterobakterijų adaptacijos rūgščiai aplinkai komponentas, kurio sintezė ląstelėje atskleidžia bakterijų pasirengimą adaptacijai rūgščioje aplinkoje;
3. Vėžinių ląstelių jautrumo gama spinduliuotei tyrimas leido sukurti modelinę sistemą, tinkamą nustatyti signalines molekules, atspindinčias ląstelių jautrumo pokyčius.
4. Signalinių molekulių, kaip įrankio ląstelių jautrumo terapiniam poveikiui vertinti naudojimas siejamas su visuminio tyrimo infrastruktūros plėtra.

## Literatūra

### Apžvalgoje apibendrinamų darbų sąrašas

Straipsniai leidiniuose, įtrauktuose į Mokslinės informacijos instituto (ISI) duomenų bazes

1. Gaffre M, Dupre A, Valuckaitė R, Sužiedėlis K, Jessus C, Haccard O. Deciphering the H-Ras pathway in *Xenopus* oocyte. *Oncogene*. 2006; 25:5155-62;
2. Dupre A., Sužiedėlis K., Valuckaitė R., DeGunzburg J., Ozon R., Jessus C., and Haccard O. *Xenopus* H-Ras V12 promotes entry into meiotic M-phase and cdc2 activation independently of Mos and p42MAPK. *Oncogene*. 2002; 21: 6424-33;
3. Šeputienė V., A. Daugelavičius, K. Sužiedėlis, E. Sužiedėlienė. Acid adaptation of exponentially growing *E. coli* K-12. *Microbiology research*. 2006; 161: 65-74;
4. Šeputienė V., K. Sužiedėlis, S. Normark., O. Melefors. E. Sužiedėlienė. Transcription analysis of acid-inducible *asr* gene in enterobacteria. *Research in Microbiology*. 2004; 155: 535-42;
5. Šeputienė, V., Motiejūnas, D., Sužiedėlis, K., Tomenius, H., Normark, S., Melefors, Ö. and Sužiedėlienė, E. Molecular characterization of the acid-inducible *asr* gene of *Escherichia coli* and its role in acid stress response. *Journal of Bacteriology*. 2003; 185: 2475-84;
6. Sužiedėlienė, E., K. Sužiedėlis, V. Garbenčiūtė, and S. Normark. The acid-inducible *asr* gene in *Escherichia coli*: transcriptional control by the *phoBR* operon. *Journal of Bacteriology*. 1999; 181: 2084-92;
7. Rime, H., N. Talbi, M. R. Popoff, K. Suziedelis, C. Jessus and R. Ozon. Inhibition of small G proteins by *Clostridium sordellii* lethal toxin activates cdc2 and MAP kinase in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology*; 1998; 204:5 92-602;
8. Šeputienė V., K. Sužiedėlis, E. Sužiedėlienė. Acid adaptation of *Escherichia coli*: a genetic study. *Biologija*. 2005; Nr.1: 15-20;
9. Jarmalaitė S., Jankevicius F., Kurgonaitė K., Sužiedėlis K., Mutanen P., Husgafvel-Pursiainen K. Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology*. 2008; 75: 145-51.

Straipsniai leidiniuose, įtrauktuose į kitas tarptautines duomenų bazes, patvirtintas Lietuvos mokslo tarybos

10. Vidugirienė J., Goueli S., Sužiedėlis K. RNA interference: from a research tool to a novel therapeutic agent. *Acta medica Lituanica*. 2007; 3: 161-5;
11. Stančiūtė D., Girulytė A., Ulys A., Jankevičius F., Sužiedėlis K., Chvatovič G. Matrix metalloproteinase 3 and matrix metalloproteinase 9 expression and polymorphism analysis in bladder cancer. *Acta medica Lituanica*. 2007; 3: 166-9;



12. Gudlevičienė Z, Didžiapetrienė J, Sužiedėlis K, Lapkauskaitė L. Investigation of human papillomavirus, its types and variants. *Medicina*. 2005; 11: 910-5;
13. Valuckaitė R, Sužiedėlienė E., Jessus C., de Gunzburg J., Sužiedėlis K. Cloning and initial characterization of the genes coding for members of Ras protein family from *Xenopus laevis*. *Biologija*. 2004; N2 (priedas 1): 18-22;
14. Valuckaitė R., Sužiedėlienė E., Sužiedėlis K. Involvement of K-Ras during meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes. *Biologija*. 2004; N3: 52-7;
15. Armalytė J., V. Šeputienė, K. Sužiedėlis, E. Sužiedėlienė. Cloning and expression analysis of the *yeaD*, *yajQ* and *yjeE* genes from *Escherichia coli*. *Biologija*. 2004; N2 (priedas 1):1-5;
16. Armalytė J., V. Šeputienė, K. Sužiedėlis, E. Sužiedėlienė. The *dinJ* gene from *Escherichia coli*: cloning, expression and influence on the cell survival to acid stress. *Biologija* 2004; N2 (priedas 1): 6-10;
17. Sužiedėlienė E., Markuckas A., Jessus C., and K. Sužiedėlis. Meiotic maturation induced by denatured Mos protein in *Xenopus laevis* oocytes. *Biologija*. 2000; N2: 161-166.

#### Kitos publikacijos

18. Sužiedėlis K., E. Sužiedėlienė, V. Pašukonienė, D. Characiejus. Vėžio biologija. Mokymo priemonė aukštosios mokykloms, Mokslo tyros institutas, Vilnius, 2008 (skaitmeninis (CD) formatas);
19. Stančiūtė D., Chvatovič G., Aleksandravičienė Č., Sužiedėlis K. Biobanko ruošimo metodai. Metodinė priemonė, Mokslo tyros institutas, Vilnius, 2008 (skaitmeninis (CD) ir spausdintas formatas);
20. Jarmalaitė S., Kleizaitė V., Sužiedėlis K., Žvingila D. Molekulinės genetikos pratybos. Metodinė priemonė, Leidykla „Technologija“, KTU, 2008.

#### Kiti šaltiniai

1. Allende C.C., Hindrichs M.V., Santos E., and Allende J.E. Oncogenic Ras protein induces meiotic maturation of amphibian oocytes in the presence of protein synthesis inhibitors. *FEBS Letters*. 1989; 234:426-30;
2. Aspenström P. Integration of signalling pathways regulated by small GTPases and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2004; 1742:51-8;
3. Booth I.R., Cash P., and O'Byrne. Sensing and adapting to acid stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002; 81:33-42;
4. Cho, U.S., Bader M. W., Amaya M.F., Daley M. E., Klevit R.E., Miller S.I., and Xu W. Metal bridges between the PhoQ sensor domain and the membrane regulate transmembrane signaling. *Journal of Molecular Biology*. 2006; 356:1193–1206;
5. DeRisi J., Penland L., Brown P.O., Bittner M.L., Meltzer P.S., Ray M, Chen Y., Su Y.A., and Trent J.M. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*. 1996; 14:457–60;
6. Deloukas, P. et al. A physical map of 30,000 human genes. *Science*. 1998; 282:744–46;

7. Donovan, S., Shannon, K. M. and Bollag G. GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *BBA Review Cancer*. 2002; 1602:23–45;
8. Downward J. Ras signalling in apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development*. 1998; 8: 49-54;
9. Esteller M. Relevance of DNA methylation in management of cancer. *Lancet Oncology*. 2003; 4:351-358.
10. Ferby I., Blazquez M., Palmer A., Eritja R. and Nebreda A.R. A novel p34cdc2-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes and Development*. 1999; 13:2177-89.
11. Flores, E.R. and Lambert P. F. 1997. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J. Virol*. 71:7167–7179.
12. Hendrickson W.A. Transduction of biochemical signals across cell membranes. *Quarterly reviews biophysics*. 2005; 38:321-30;
13. Jesus C., Rime, H. and Ozon R. Ras family proteins: new players involved in the diplotene arrest of *Xenopus* oocytes. *Biology of the Cell*. 1998; 90:573-83;
14. Just I., Selzer J., Hoffmann F., Green G. and Aktories K. Inactivation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin – catalyzed glucosylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271: 10149-53;
15. Karnoub A.E and Weinberg R.A. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews molecular and cell biology*. 2008; 9:517-31;
16. Lamarche M.G., Wanner B.L., Crepin S. and Harel J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*. 2007; 32:461-73;
17. Laub M.T. and Goulian M. Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review Genetics*. 2007; 41:121-45;
18. Macaluso M., Russo, G., Cinti C., Bazan, V., Gebbia N. and Russo, A. Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2002; 192: 125-30;
19. Malumbres M. and Barbacid M. Ras oncogenes: the first 30 years. *Cancer*. 2003; 3:7-13;
20. McFarlin D., Lindstrom M.J. and Gould M. Affinity with Ras is sufficient for Ras to efficiently induce rat mammary carcinomas. *Cancerogenesis*. 2003; 24:99-105;
21. Milde-Langosch K., Riethdorf S. and Loning T. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Archives*. 2000; 437:227-233;
22. Mittin N, Rossman K.L. and Der C.J. Signalling interplay in Ras superfamily function. *Current Biology*. 2005; 15:R563-74;
23. Niida H. and Nakanishi H. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*. 2006; 21: 3-9;
24. Olive M., Thiebaud P., Landry M., Duver M., Verna A., Barillot W. and Theze N. Using *Xenopus* as a model system for an undergraduate laboratory course in vertebrate development at the university Bordeaux, France. *International Journal of Developmental Biology*. 2003; 47:153-60;
25. Paduch M., Jelen, F., Otlewski J. Structure of small G proteins and their regulators. 2001. *Acta Biochimica Polonica*. 2001; 48:829-50;
26. Pinkel, D. et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics*. 1998; 20:207–11;
27. Pollack J.R., Perou C.M, Alizadeh A.A, Eisen M.B, Pergamenschikov A, Williams C.F, Jeffrey S.S, Botstein D and Brown P.O. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature Genetics*. 1999; 23:41–6;
28. Raaijmakers J., and Bos. J.L. Specificity in Ras and Rap signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2008; December 17.
29. Rodrigues-Viciana P., Sabatier C. and McCormick F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Molecular Cell Biology*. 2004; 24:4943-54;
30. Rajalingam K., Schreck R., Rapp U.R. and Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2007; 1773:1177–95;
31. Rychlik I. and Barrow P.A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005; 29:1021-40;

32. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995; 270:467–70;
33. Shubert S., Shannon K., and Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature reviews cancer*. 2007; 7:295-308;
34. Sternlicht M.D. and Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual Reviews in Cell and Developmental Biology* 2001;17:463-516.
35. Tucker D.L., Tucker N. and Conway T. Gene expression profiling of the pH response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2002; 184:6551–8;
36. Vargas R.A., Botero L., Lagos L. and Camacho M. *Bufo marinus* oocytes as a model for ion channel protein expression and functional characterization for electrophysiological studies. *Cell Physiology and Biochemistry*. 2004; 14:197-202;
37. White M.A., Nicolette C., Minden A., Polverino A., Van Aelst L., Karin M. and Wigler M.H. Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell*. 1995; 80:533-41.
38. Yohannes E., Barnhard D.M. and Slonczewski J.L. pH-dependent catabolic protein expression during anaerobic growth of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2004; 186:192-9;