

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
MEDICĪNAS FAKULTĀTE  
FARMĀCIJAS STUDIJU PROGRAMMA

**CIKLISKĀ ADENOZĪNMONOFOSFĀTA LĪMEŅU  
ATŠĶIRĪBAS STARP CILMES ŠŪNU DONORIEM**

MAĢISTRA DARBS

Autore: **Anete Laizāne**

Stud. apl. al05015

Darba vadītāja: profesore Dr. hab. biol. Ruta Muceniece

RĪGA 2010

## ANOTĀCIJA

Šūnu sekundārās signālpārnese molekula cikliskais adenozinmonofosfāts (cAMF) iesaistās cAMF/proteīnkināzes A signālceļu kaskādē, aktivējot transkripcijas faktoros (CREB) un veicinot dažādu gēnu ekspresiju un proteīnu sintēzi. Cilmes šūnu kultivēšana ar cAMF stimulētājiem var ietekmēt to likteni pēc transplantācijas cilvēka organismā. Tādēļ pirms šūnu izmantošanas terapijā jānoskaidro cAMF līmeņu svārstības dažādu augšanas faktoru un citu proliferācijas stimulatoru klātbūtnē *in vitro* kultūrās.

Maģistra darba mērķis bija salīdzināt no 48 donoru ādas cilmes šūnu kultūrām brīvi izvēlētu astoņu dermas cilmes šūnu kultūru cAMF bazālos līmeņus un šo šūnu reakciju uz cAMF producēšanās stimulāciju. Atklājām, ka pastāv donoru šūnu atšķirības cAMF bazālajā līmenī un atbildes reakcijā uz stimulāciju ar dibutiril-cAMF, augšanas faktoriem un forskolīnu. Šūnas stimulējot ar forskolīnu, novērojām lielākas cAMF līmeņu svārstības kā ar augšanas faktoriem. Atšķirības totālā CREB līmeņos nestimulētām šūnām nebija statistiski ticamas. Var secināt, ka donoru cilmes šūnu cAMF bazālie līmeņi un atbildes reakcija uz stimulatoriem atšķiras, un tādēļ vielu farmakoloģisko efektu pētījumi dažādu donoru cilmes šūnu kultūrās var dot pretrunīgus rezultātus.

**Atslēgvārdi:** cikliskais adenozinmonofosfāts, cilmes šūnas, dibutiril-cikliskais adenozinmonofosfāts, forskolīns, cAMF atbildes element-saistošais proteīns.

## ANNOTATION

Secondary messenger molecule cyclic adenosine monophosphate (cAMP) participates in cAMP/protein kinase A signaling pathway, activating transcription factors (CREB) and contributing to the different gene expression and protein synthesis. Stem cell culturing with cAMP stimulators can influence their fate after transplantation in humans. Therefore, prior to the use of cells in the therapy, we need to ascertain cAMP level fluctuations in the presence of various growth factors and other proliferation promoters of *in vitro* cultures.

Goal of the master thesis was to compare chosen at random eight dermis stem cell culture, obtained from the 48 donors, cAMP basal levels and the cellular response to stimulation of cAMP production. We discovered that there are differences among donor cells in cAMP basal levels and response to stimulation with dibutyryl-cAMP (db-cAMP), growth factors and forskolin. In cells, stimulated with forskolin, we observed greater fluctuations of cAMP levels compared with growth factor. The differences of total CREB levels in non-stimulated cells were not statistically significant. It can be concluded that cAMP basal levels of the donor stem cells and response to different stimulators vary, and hence the pharmacological effects of substances in various studies in the donor stem cell cultures may give conflicting results.

**Key words:** cyclic adenosine monophosphate, stem cells, dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate, forskolin, cAMP response element-binding protein.

# SATURS

Apzīmējumu saraksts.....	6
Ievads.....	8
1. Literatūras apskats .....	10
1.1. Cilmes šūnas .....	10
1.1.1. Embrionālās cilmes šūnas.....	10
1.1.2. Fetālās cilmes šūnas.....	11
1.1.3. Pieauguša organisma cilmes šūnas .....	11
1. 2. Eksperimentos izmantotās cilmes šūnas.....	12
1.2.1. Ādas dermas cilmes šūnas .....	12
1.3. Intracelulārās signālceļu kaskādes.....	12
1. 4. Ar G proteīnu saistītie receptori (GPCR) .....	13
1.4.1. GPCR uzbūve un funkcijas.....	14
1.4.2. GPCR regulācija .....	15
1.4.3. GPCR gēnu transkripcijas aktivācija .....	15
1.5. Adenilciclāze .....	16
1.6. Cikliskais adenozinmonofosfāts (cAMF).....	16
1.6.1. cAMF bioloģiskā aktivitāte .....	17
1.6.2. <i>Anchoring</i> proteīni.....	18
1.6.3. Fosfodiesterāzes .....	19
1.7. Proteīnkināzes un fosfatāzes.....	20
1.7.1. cAMF aktivētā proteīnkināze A (PKA).....	20
1.7.2. PKA aktivācija regulē glikogēna metabolismu .....	22
1.8. CREB proteīns.....	22
1.9. cAMF analoģu un augšanas faktoru ietekme uz cAMF sintēzi.....	23
2. Materiāli un metodes .....	25
2.1. Aparatūra un izmantotie trauki .....	25
2.2. Eksperimentos pētītās vielas.....	26
2.3. Šūnas.....	26
2.4. Šūnu proliferācijas mērīšana.....	28

2.5. cAMF līmeņa noteikšana.....	28
2.6. Forskolīna efektu pētīšana.....	32
2.7. Totālā CREB proteīna noteikšana .....	33
2.8. Totālā proteīna daudzuma noteikšana .....	35
2.9. Datu statistiskā analīze .....	35
3. Rezultāti.....	36
3.1. Db-cAMF un augšanas faktoru efekti uz šūnu proliferāciju .....	36
3.2. Bazālā cAMF līmeņa svārstības dažādu donoru šūnu līnijās .....	38
3.3. Totālā (neaktivētā plus aktivētā) CREB līmeņi dažādu donoru šūnu līnijās.....	39
3.4. Forskolīna ietekme uz cAMF producēšanos .....	40
Diskusija.....	41
Secinājumi .....	43
Literatūra .....	45

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

cAMF - cikliskais adenozinmonofosfāts;  
db-cAMF - dibutiril-cikliskais adenozinmonofosfāts;  
PKA=A kināze - proteīnkināze A;  
CREB - cAMF atbildes element-saistošais proteīns = CRE saistošais proteīnu;  
GPCR - ar G proteīnu saistītie receptori;  
MSC - mezenhimālās cilmes šūnas;  
FBS - liellopu asins serums;  
EGF - epidermālais augšanas faktors;  
FGF- fibroblastu augšanas faktors;  
cGMF - cikliskais guanozinmonofosfāts;  
DAG - diacilglicerols;  
IF<sub>3</sub> - inozitoltrifosfāts;  
G proteīns – guanīna nukleotīdu saistošais proteīns;  
G<sub>(α,β,γ,q)</sub> apakšvienības - G proteīna apakšvienības (α, β, γ, q);  
G<sub>βγ</sub> apakšvienība - G proteīna saistītās apakšvienības β un γ;  
G<sub>s</sub> - stimulatorais G proteīns;  
GTFāze - guanozīna trifosfatāze;  
GTF - guanozīna trifosfāts;  
GDF - guanozīna difosfāts;  
AC - adenilciclāze;  
ACTH - adreno-kortikotropais hormons;  
PGE1 - prostaglandīns E1;  
CD4<sup>+</sup> - T limfocītu šūnu līnija;  
A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub> - adenozīna receptoru apakštipi;  
Epac - apmaiņas proteīns, ko tieši aktivē cAMF;  
FDE - fosfodiesterāze;  
AKAP - ar A kināzi saistītais proteīns;  
mAKAP - muskuļu ar A kināzi saistītais proteīns;  
AKAP15 - ar A kināzi saistītais proteīns 15;

CRP - katabolītu regulatorais proteīns;  
R apakšvienība - regulatorā apakšvienība;  
K apakšvienība - katalītiskā apakšvienība;  
DNS - dezoksiribonukleīnskābe;  
CRE - cAMF atbildes elements;  
CBP - CREB-saistošais proteīns;  
CBP/P300 - transkripcijas koaktivātoru ģimene;  
IL-6 - interleikīns-6;  
TGF-β1 - transformējošais augšanas faktors – beta1;  
FRTL-5 - *Fischer Rat Thyroid Low Serum 5%*;  
GH<sub>3</sub> - hipofīzes šūnu līnija;  
LIF - leukēmijas inhibitorais faktors;  
B27 - šūnu barotnes piedeva;  
DMEM/F12 - šūnu barotne ar serumu;  
EDTA - etilēndiamīntetraetiķskābe;  
FEB - šūnu bez seruma barotne ar augšanas faktoriem;  
FEBIT - FEB barotne papildināta ar insulīnu un transferīnu;  
WST-8 - tetrazolija sāls;  
HRP - mārrutku peroksidāze;  
OD - optiskais blīvums;  
PBS - fosfātu buferšķīdums;  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - ūdens;  
NSB - nespecifiskā saistīšanās;  
IgG - imūnglobulīns G;  
BSA - liellopa seruma albumīns;  
AKE - angiotenzīna konvertējošais enzīms;  
Swiss 3T3 - peļu embriju fibroblastu šūnu līnija;  
ERK - ekstracelulāro signālu regulētās kināzes;  
MAPK - mitogēnu aktivētā proteīnkināze;  
Ras, Raf - pro-onkogēnie proteīni;  
MEK - mitogēnu aktivētās proteīnkināzes kināze=MAP2K1;

## IEVADS

Cikliskais adenozinmonofosfāts (cAMF) ir izplatīta sekundārās signālpārneses molekula visās zīdītāju šūnās, un tā pastiprināta producēšanās liecina par ierosinātu signālceļu kaskādi, kurā secīgi iesaistās cAMF, proteīnkināzes, transkripcijas faktori, piemēram, cAMF atbildes element-saistošais proteīns (CREB), veicinot dažādu gēnu ekspresiju un proteīnu sintēzi. Šo procesu rezultātā novēro šūnas fizioloģisko reakciju.

cAMF līmeņa mērījumus plaši izmanto vielu farmakoloģisko efektu izvērtēšanai, lai izpētītu dažādu vielu atšķirīgu iedarbību uz šūnu augšanu un funkcionalitāti. Tomēr cilmes šūnu kultūras tikai pēdējā laikā izmanto farmakoloģiski aktīvo vielu darbības pētījumos, arī cilmes šūnu barotņu sastāva loma nav līdz galam izprasta šūnu proliferācijas un diferencēšanās veicināšanai.

Cilmes šūnu terapija ir viena no jaunākajām un perspektīvākajām medicīnas jomām pasaulē, tā pārstāv jaunu nozari – reģeneratīvo medicīnu. Tā varētu ļaut tuvākā vai tālākā nākotnē novērst tādas neārstējamas vai grūti ārstējamas slimības kā miokarda infarkts, diabēts, neurodeģeneratīvās saslimšanas (Pārkinsona un Alcheimera slimības, multiplā skleroze), artrīts, kā arī daudzas citas iedzimtas kaites. Tādēļ daudzās attīstītajās pasaules valstīs un arī Latvijā notiek aktīva cilmes šūnu pētīšana un eksperimentālo datu uzkrāšana.

Pētnieki ir ieinteresēti ātrā šūnu pavairošanā, tāpēc barotnēm pievieno dažādus aģentus – bazālo fibroblastu un epidermālo augšanas faktoros, liellopu asins serumu, hormonus u.c., kuri var ietekmēt šūnu signālkaskādes. Pētījumos demonstrēts, ka mainot cAMF intracelulāro līmeni cilmes šūnās, var iegūt strīdīgus efektus. Piemēram, pakļaujot šūnas cAMF līmeni paaugstinošiem faktoriem, tiek inhibēta adipozo cilmes šūnu proliferācija (1, 2), bet ierosināta mezenhimālo cilmes šūnu (MSC) neironālā diferencēšanās (3). Mezenhimālo cilmes šūnu sākotnējo neironālo diferencēšanos izraisa cAMF, un tā šķiet atkarīga no  $Ca^{2+}$  un proteīnkināzes A (PKA) signālceļu kaskādes, turpretim, pieauguši mezenhimālie līdzinieki ir ar ierobežotu neuroģenētisko potenciālu, salīdzinot ar fetālām nervu cilmes šūnām (4).

Izteikts pieņēmums, ka cilmes šūnu kultivēšana cAMF stimulētājvielu klātbūtnē var ietekmēt to likteni pēc transplantācijas cilvēka organismā. Tāpēc ir svarīgi pirms šūnu izmantošanas terapijā noskaidrot cAMF līmeņu svārstības dažādu augšanas faktoru un citu proliferācijas stimulatoru klātbūtnē *in vitro* kultūrās. Iespējams, ka arī ar sastāvdaļām bagātā

vidē daži komponenti darbojas atšķirīgos virzienos. Kādi no tiem saglabā šūnu neizmainītu, bet citi veicina spontānu diferencēšanos.

Šūnu audzēšanas barotnēm parasti pievieno liellopu asins serumu (FBS). FBS ir vajadzīgs arī, lai šūnas augtu kā adherentas šūnas. Šūnu augšanas un dalīšanās laikā tiek ierosināti daudzi signālpārnēses ceļi, arī ar cAMF saistītie, tāpēc šūnu barotnēm pievieno dibutiril-cAMF (db-cAMF), kas ir šūnu membrānu šķērsot spējīgs cAMF analogs. Dibutiril-cAMF nonāk šūnā un imitē tos procesus, ko izraisītu cAMF līmeņa paaugstināšanās. Šūnas stimulējot ar tiešo adenilciklāzes aktivitātes veicinātāju forskolīnu, arī tiek panākts cAMF intracelulārā līmeņa pieaugums, līdzīgi tas notiek pēc daudzu ar G proteīnu saistīto receptoru aktivācijas.

Maģistra darba mērķis bija salīdzināt no 48 donoru ādas cilmes šūnu kultūrām brīvi izvēlētu astoņu dermas cilmes šūnu kultūru cAMF bazālos līmeņus un šo šūnu reakciju uz cAMF producēšanās stimulāciju.

Lai sasniegtu mērķi tika izvirzīti darba uzdevumi:

1. Izpētīt bazālā cAMF līmeņa svārstības dažādu donoru ādas cilmes šūnu kultūrās.
2. Salīdzināt totālā (neaktivētā + aktivētā) CREB līmeņus no dažādiem donoriem izolētām cilmes šūnu līnijām.
3. Noteikt db-cAMF, fibroblastu augšanas faktora (FGF) un epidermālā augšanas faktora (EGF) ietekmi uz dermas cilmes šūnu proliferāciju.
4. Noskaidrot forskolīna ietekmi uz cAMF producēšanos dermas cilmes šūnu kultūrās.

Maģistra darbs izstrādāts LU Medicīnas fakultātes farmācijas programmā

Pētījums daļēji finansēts par ESF Nr. 2009/0217/ 1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/031 projekta līdzekļiem.

Darba rezultātu aprobācija:

Kaspars Jēkabsons, Una Riekstiņa, Inese Čakstiņa, Vadīms Parfejevs, Anete Laizāne, Laura Kulvinska, Evija Sidorova, Ruta Muceniece *cAMP līmeņa atšķirības dažādu donoru dermas cilmes šūnās in vitro kultūrās*. LU 68. Zinātniskā konference, Medicīnas sekcija, Bāzes zinātnes, Rīga, Latvija, 5. februāris, 2010, Tēzes, 14-15.lpp.

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

## 1.1. Cilmes šūnas

Termins *cilmes šūnas* tiek lietots, lai aprakstītu nespecializētas šūnas, kas kalpo kā krātuve jaunām šūnām, kuras aizvieto citas bojātas vai mirstošas šūnas, jo cilmes šūnas var neierobežoti ilgi reproducēties daloties. Cilmes šūnas noteiktos apstākļos var specializēties, diferencēties, veidojot asins, nervaudu, ādas, aknu, aizkuņģa dziedzera un citas specializētas šūnas. Cilmes šūnas tiek plaši iedalītas 3 grupās: pieaugušo cilmes šūnas, fetālās cilmes šūnas un embrionālās cilmes šūnas (5). Cilmes šūnas var raksturot ar to pagarināto pašatjaunošanās kapacitāti un asimetrisko replikāciju. Šāda replikācija raksturo cilmes šūnu īpašību, kad daļa cilmes šūnu replicējas, bet citas diferencējas. Cilmes šūnas ir atrodamas gan embrijos, kā pluripotentas šūnas, gan daudzos pieaugušo cilvēku audos, kur tās piedalās šūnu homeostāzes nodrošināšanā. Novērojumi, kas veicinājuši cilmes šūnu izpēti, ir, piemēram, cilmes šūnu atrašana dažādos audos un arī smadzenēs, atklātā kaulu smadzeņu cilmes šūnu plašā diferenciācijas spēja un fakts, ka dažas cilmes šūnas cilvēka un peles audos ir līdzīgas embrionālām cilmes šūnām (6).

### 1.1.1. Embrionālās cilmes šūnas

Visu sugu embriji pirms orgānu veidošanās satur šūnas, kas spējīgas radīt daudzus dažādus orgānus un audus. Šādām šūnām ir potenciāls diferencēties daudzveidīgos fenotipos un tādēļ tās tiek sauktas par pluripotentām cilmes šūnām. Pirmoreiz iegūstot tās no peles embrija, tika atklāta to ievērojamā plasticitāte. Tās var bezgalīgi dalīties laboratorijas apstākļos un arī noteiktu augšanas faktoru ietekmē saglabāt diferencēšanās spēju neskaitāmos šūnu tipos (7). Embrionālās cilmes šūnas var izolēt no struktūras, kas formējas embrija attīstības laikā 32-šūnu stadijā – blastocistas. Tās tiek izmantotas, lai izpētītu specifiskos signālus un diferenciācijas posmus, kas nepieciešami daudzu audu attīstībā, kā arī ģenētiski izmainītos peļu modeļos, kas veidojušies, kultivētas cilmes šūnas injicējot blastocistā un to implantējot surogātmātes dzemdē. Šīs pluripotentās cilmes šūnas vēlākos gados varētu izmantot, lai atjaunotu bojātus orgānus, piemēram, aknas pēc hepatocītu nekrozes un miokardu pēc infarkta. Terapeutiskos nolūkos jau tiek izmantotas kultivētas aizkuņģa dziedzera  $\beta$ -šūnas un neironi (6).

### **1.1.2. Fetālās cilmes šūnas**

Trešajā grūtniecības mēnesī jau ir izveidojušies placenta un auglis, kā arī orgānu aizmetņi. Nākamo sešu grūtniecības mēnešu laikā orgāni palielinās un attīstās to spēja funkcionēt neatkarīgi no placentas. Tā kā auglis aug ļoti strauji, visi audi un orgāni, ieskaitot smadzenes, satur cilmes šūnas, ko apzīmē kā fetālās cilmes šūnas jeb augļa cilmes šūnas, kas arī ir pluripotentas šūnas tāpat kā embrionālās cilmes šūnas. Trīs galvenie fetālo cilmes šūnu avoti ir: trofoblasta cilmes šūnas, dīgļa cilmes šūnas un fetālo audu cilmes šūnas. Galvenās grūtniecības ilgtermiņa pašatjaunoties spējīgu šūnu populāciju iegūšanā ir to neaizkavējamā diferenciacija (5).

### **1.1.3. Pieauguša organisma cilmes šūnas**

Daži audi un orgāni arī pēc augļa pilnīgas izveidošanās saglabā cilmes šūnu populācijas bērnības gados un pieauguša cilvēka dzīves laikā. Tās tiek dēvētas par pieaugušo cilmes šūnām (autologām vai somatiskām cilmes šūnām) jau pirmajos cilvēka dzīves gados, šīs cilmes šūnas var būt gan pluripotentas (hematopoētiskās cilmes šūnas), multipotentas (mata saknes cilmes šūnas), gan arī unipotentas (muskulu cilmes šūnas). Tās ir pašatjaunojošos šūnu populācijas tādos pieaugušo audos, kas paši ir spējīgi atjaunoties, piemēram, mati, āda, asinis, kuņģa-zarnu trakta gļotāda, aknas un spermatoģenēze (6). Ādas šūnas un asinsvadi viegli reģenerējas un atjauno bojātās vietas. Tāpat kā šūnas, kas izklāj kuņģi un zarnas, arī tiek regulāri aizvietotas. Tādēļ pieaugušo cilmes šūnu galvenā pazīme ir to spēja dalīties visas dzīves garumā un veidot specializētus šūnu tipus. Tomēr to diferenciacijas kapacitāte ir ierobežota un specifiska, jo, piemēram, asinsvadu cilmes šūnas var atjaunot asinsvadus, bet nevar veidot spermu, savukārt spermatoģoni nevar veidot asinis (7).

Tomēr ir arī audi un orgāni, kas nespēj reģenerēties, jo nesatur pietiekami daudz cilmes šūnu populāciju. Tādi audi ir, piemēram, smadzenes, sirds, muguras smadzenes, acis un nieres. Kaut gan šajos audos arī ir atrastas nelielas cilmes šūnu populācijas, pagaidām nav veikta to izolācija un pavairošana laboratorijas apstākļos, lai varētu tās izmantot terapeitiskos nolūkos. Divi iespējamie to iegūšanas varianti varētu būt biopsijas rezultātā no bojātā orgāna vai arī no pieaugušo donoru orgāniem, kas paredzēti tādām mērķim. Pagaidām visizplatītākā cilmes šūnu

terapeitiskā lietošana ir kaulu smadzeņu pārstādīšanas gadījumā, jo tām ir atrasts visplašākais pieaugušo cilmes šūnu diferenciācijas potenciāls. Kaulu smadzenes ir arī salīdzinoši viegli iegūstamas, un klīniski nepieciešamība aizvietot hematopoētiskās šūnas ir ļoti daudzos gadījumos (5).

## **1.2. Eksperimentos izmantotās cilmes šūnas**

### **1.2.1. Ādas dermas cilmes šūnas**

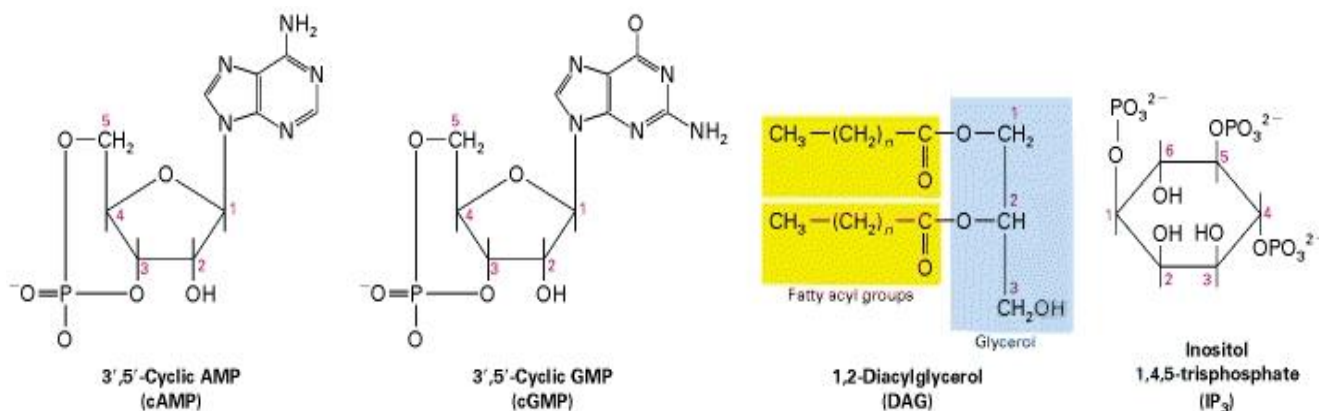
Autologās cilmes šūnas tiek pētītas kā iespējama terapeitiskā alternatīva embrionālām cilmes šūnām. To pierāda pieauguša organisma cilmes šūnu daudzveidīgais diferenciācijas potenciāls (8). Multipotenti autologo šūnu priekšteči var tikt izolēti un attīstīti no viegli pieejama pieaugušo audu avota – ādas. Joprojām ir nepieciešams pilnveidot priekšteču šūnu iegūšanu no pieaugušo pacientu biopsijām un to funkcionalitātes novērtēšanu *in vivo* un *in vitro*. Ādas cilmes šūnas saglabā līdzīgas īpašības pat līdz 1 gadam šūnu kultūrā. Tās var veidot gan nervu, galvenokārt perifēros neironus un Švāna šūnas, gan mezodermas šūnu tipus. Arī atsevišķas ādas priekšteču šūnas ir multipotentas un var ģenerēt neironus, glijas šūnas, gludo muskuļu šūnas un adipocītus (9).

### **1.3. Intracelulārās signālceļu kaskādes**

Organismā sazināšanās ar ekstracelulāriem signāliem ietver šādus posmus: šūna, kas signalizē, sintezē un atbrīvo signālmolekulu; signāla transports uz mērķšūnu; signāla saistīšanās pie specifiska receptora proteīna, kas noved pie tā aktivācijas; aktivētais receptors ierosina vienu vai vairākas intracelulārās signālceļu kaskādes; seko specifiskas izmaiņas šūnas funkcijās, metabolismā vai attīstībā; signāla noņemšana, kas bieži vien pārtrauc šūnas atbildes reakciju.

Dažas receptoru klases var ierosināt signāla pārraidi caur vairāk nekā vienu intracelulāru signālceļu kaskādi, kam seko atšķirīgas šūnu atbildes reakcijas. Šī īpašība ir izteikta ar G proteīnu saistītiem receptoriem, receptoru tirozīnkināzēm un citokīnu receptoriem (10).

Ligandu (primāro mesendžeru) saistīšanās pie daudziem šūnas virsmas receptoriem izraisa noteikta zema molekulārā svara **intracelulāro signālmolekulu jeb sekundāro mesendžeru** īslaicīgu koncentrācijas pieaugumu (vai samazinājumu). Pie sekundāriem mesendžeriem pieder **3',5'-cikliskais adenozinmonofosfāts (cAMP)**, 3',5'-cikliskais guanozinmonofosfāts (cGMP), 1,2-diacilglicerols (DAG) un inozitol 1,4,5-trifosfāts (IP<sub>3</sub>) (1.1. att.), kā arī Ca<sup>2+</sup> un dažādi inozitol fosfolipīdi, saukti arī par fosfoinozītīdiem, kas iekļaujas šūnu membrānās (11).



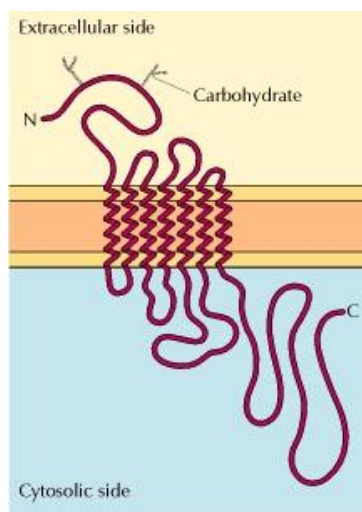
1.1. att. Četri visizplatītākie intracelulārie sekundārie mesendžeri (11)

#### 1.4. Ar G proteīnu saistītie receptori (GPCR)

Pie ļoti plašas šūnu virsmas receptoru grupas pieder receptori, kas ir saistīti ar signālpārneses trimēriem G proteīniem un ir zināmi kā **ar G proteīnu saistītie receptori jeb GPCR**. Ar G proteīnu saistīto receptoru ģimenē ietilpst liels skaits hormonu un neurotransmiteru receptoru, gaismas aktivēto receptoru (rodopsīna) acī un tūkstošiem ožas receptoru zīdītāju degunā. Līdz šim ir klonēti vairāk nekā 130 ar G proteīnu saistīto receptoru gēni no dažādām zīdītāju sugām. GPCR mediē vairākas atšķirīgas atbildes reakcijas un ir iesaistīti vairāku slimību patoģenēzē, kā arī ir galvenie mērķi farmaceutiskiem aģentiem (12).

### 1.4.1. GPCR uzbūve un funkcijas

Ar G proteīnu saistītie receptori satur 7 hidrofobus transmembrānas fragmentus ar to N-termināles segmentu ekstracelulārā plaknē un C-termināles segmentu plazmas membrānas citozola plaknē (1.2. att.). Signālu pārraidošie G proteīni satur trīs apakšvienības, kas apzīmētas kā  $\alpha$ ,  $\beta$  un  $\gamma$ . Intracelulārās signalizēšanas laikā  $\beta$  un  $\gamma$  apakšvienības paliek saistītas kopā un tiek attiecinātas uz  **$G_{\beta\gamma}$  apakšvienību**.  $G_{\alpha}$  apakšvienība guanozīna trifosfatāzei (GTFāzei) ir kā proteīns-slēdzis, kas mainās uz aktīvu stāvokli ar saistītu guanozīna trifosfātu (GTF) un uz neaktīvu stāvokli ar saistītu guanozīna difosfātu (GDF) (13).



1.2. att. Ar G proteīnu saistīto receptoru struktūra (14)

Saistītā receptora stimulācija izraisa G proteīna aktivāciju, kas savukārt modulē saistītā efektorā proteīna darbību. Kaut gan visbiežāk efektoro proteīnu aktivē  $G_{\alpha}^*GTF$ , dažreiz tas tiek inhibēts. Turklāt, atkarībā no šūnas un liganda,  $G_{\beta\gamma}$  apakšvienība labāk nekā  $G_{\alpha}^*GTF$  var pārvadīt signālu uz efektoro proteīnu. Piedevām vairākiem atšķirīgiem efektoriem proteīniem aktivitāti kontrolē dažādi GPCR-ligandu kompleksi. Visi efektorie proteīni tomēr ir vai nu ar membrānu saistīti jonu kanāli vai enzīmi, kas katalizē sekundāro mesendžeru (cAMF, DAG un  $IP_3$ ) veidošanos. Cilvēka genoms, piemēram, kodē 27 dažādas  $G_{\alpha}$ , 5  $G_{\beta}$  un 13  $G_{\gamma}$  apakšvienības. Līdz šim ir zināms, ka atšķirīgas  $G_{\beta\gamma}$  apakšvienības funkcionē līdzīgi. Kaut gan visi epinefrīna receptori ir ar G proteīnu saistītie receptori, dažādi tipi ir piesaistīti atšķirīgiem G proteīniem. Tādējādi papildus to fizioloģiskai nozīmei šie receptori izraisa dažādas intracelulāras signālceļu kaskādes (15).

Abi  $\beta$ -adrenerģisko receptoru apakštipi, saukti  $\beta_1$  un  $\beta_2$ , ir saistīti ar **stimulatoro G proteīnu ( $G_s$ )**, kas aktivē ar membrānu saistīto enzīmu **adenilciklāzi (AC)**. Pēc aktivācijas adenilciklāze katalizē sekundārā mesendžera cAMF sintēzi. Divi  $\alpha$ -adrenerģisko receptoru apakštipi,  $\alpha_1$  un  $\alpha_2$ , ir saistīti ar dažādiem G proteīniem.  $\alpha_1$ -adrenerģiskais receptors ir saistīts ar G proteīnu, kas inhibē adenilciklāzi, to pašu efektora enzīmu, kurš saistīts ar  $\beta$ -adrenerģiskiem receptoriem. Turpretim  $G_q$  proteīns, kas ir saistīts ar  $\alpha_2$ -adrenerģisko receptoru, aktivē atšķirīgu efektora enzīmu, kurš ražo citus sekundāros mesendžerus (16).

### 1.4.2. GPCR regulācija

Hormonu, kas saistās ar  $\beta$ -adrenerģiskiem receptoriem un citiem ar  $G_s$  saistītiem receptoriem, ierosināto atbildes reakciju pārtraukšanu veicina vairāki faktori. Pirmkārt, hormona afinitāte pret receptoru samazinās, kad pēc hormona saistīšanās pie  $G_s$  saistītais GDF tiek aizvietots ar GTF, tas palielina hormona disociāciju no receptora. Otrkārt, pie  $G_s$  saistītais GTF tiek ātri hidrolizēts, atceļot adenilciklāzes aktivāciju un cAMF produkciju. Treškārt, cAMF fosfodiesterāze iedarbojas, lai hidrolizētu cAMF līdz 5'-AMF, pārtraucot šūnu atbildes reakciju. Tādā veidā nepārtrauktai adenilciklāzes aktivācijai un paaugstināta cAMF līmeņa uzturēšanai ir nepieciešama pastāvīga hormona klātbūtne pietiekami augstā koncentrācijā. Kad hormona koncentrācija pietiekami samazinās, šūnu atbildes reakcija ātri izbeidzas (17).

### 1.4.3. GPCR gēnu transkripcijas aktivācija

Intracelulārām signālceļu kaskādēm var būt īstermiņa un ilgtermiņa efekti uz šūnu. Īstermiņa iedarbība (no sekundēm līdz minūtēm) rodas no jau esošu enzīmu vai citu proteīnu aktivitātes modulēšanas, izraisot izmaiņas šūnas metabolismā vai funkcijās. Lielākā daļa GPCR aktivēto signālceļu kaskāžu atbilst īstermiņa kategorijai, bet ir arī ilgtermiņa efekti (no stundām līdz dienām), jo notiek gēnu transkripcijas aktivācija vai apspiešana, kas dažos gadījumos noved līdz šūnu proliferācijai vai diferencēšanai par atšķirīga tipa šūnu (18).

## 1.5. Adenilciklāze

Mainīgais trimērais G proteīns ļauj dažādiem receptora-hormona kompleksiem modulēt viena un tā paša efektorā proteīna aktivitāti. Piemēram, aknās glikagons un epinefrīns saistās pie atšķirīgiem receptoriem, bet abi receptori mijiedarbojas ar  $G_s$  un aktivē to, tālāk aktivējot adenilciklāzi un tādā veidā izraisot tās pašas metaboliskās atbildes reakcijas. Adenilciklāzes aktivācija un tādējādi arī cAMF līmenis ir proporcionāls totālai  $G_{sa} \cdot GTF$  koncentrācijai, kas izriet no abu hormonu saistīšanās pie to attiecīgajiem receptoriem (19). Dažiem šūnu tipiem sastopama pozitīvā un negatīvā adenilciklāzes regulēšana, nodrošinot ārkārtīgi precīzu kontroli cAMF līmenim. Piemēram, adipozo šūnu stimulēšana ar epinefrīnu, glikagonu vai adreno-kortikotropo hormonu (ACTH) aktivē adenilciklāzi, turpretim prostaglandīns E1 (PGE1) vai adenozīns inhibē enzīmu (20).

## 1.6. Cikliskais adenozinmonofosfāts (cAMF)

Cikliskais AMF bija pirmais intracelulārais signāls, kas identificēts zīdītāju šūnās. cAMF tika atklāts gandrīz 50 gadus atpakaļ kā faktors, kas aknās mediē hormonu glikagona un epinefrīna intracelulāro iedarbību uz glikogēna metabolismu (21). Par šo atklājumu 1971. gadā zinātnieks *Sutherland* saņēma Nobela prēmiju (22).

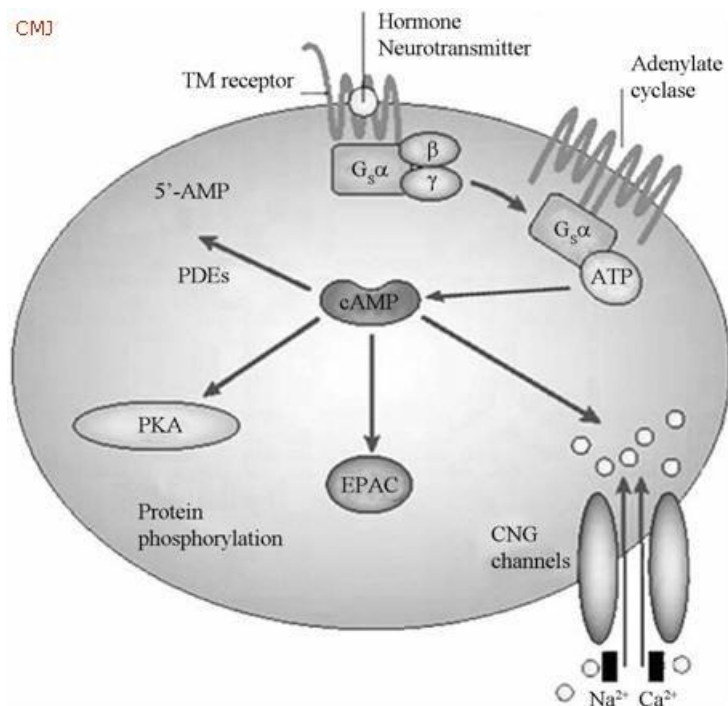
Gadiem ejot parādījās vairāki ziņojumi par to, ka pēc agonistu stimulācijas cAMF tiek izdalīts no daudziem un dažādiem šūnu tipiem, ieskaitot adipocītus (23), hepatocītus, nieru epitēlija šūnas (24), neironu šūnas (25), fibroblastus, T limfocītus (26) un skeleta muskuļus (27). Tomēr šī šūnu spēja izdalīt sekundāros mesendžerus ir specifiska šūnu tipam, jo citi tipi neuzrāda īpašību izgrūst cAMF. Tā eksports var notikt pa koncentrācijas gradientu, ir atkarīgs no temperatūras un tam nepieciešama enerģija ATF formā (28). Kvantitatīvi cAMF daudzums, ko izdala noteikta tipa šūnas, var būt diezgan nozīmīgs. Piemēram, cilvēka  $CD4^+$  T limfocītus stimulējot ar holēras toksīnu, tie ekstracelulārā telpā atbrīvo vairāk kā 50% no kopējā 24 stundu laikā saražotā cAMF (26).

Cilvēkiem cAMF koncentrācijas plazmā un urīnā dramatiski var paaugstināt dažādi fizioloģiskie stāvokļi un arī eksogēnu cAMF līmeni paceļošu hormonu (īpaši epinefrīna, parathormona un glikagona) infūzija. Izveidojies sekundārais mesendžers var tikt aktīvi

transportēts uz ekstracelulāro telpu, izmantojot probenecīda un sulfīnpirazona jutīgo noplūdes mehānismu. Ir vispāratzīts, ka ekstracelulārais cAMF var tikt secīgi metabolizēts, vispirms ar ekto-fosfodiesterāzi līdz adenozīna monofosfātam (AMF), un tad ar ekto-5'-nukleotidāzi līdz adenozīnam. Pēc tam adenozīns var darboties kā parakrīns vai autokrīns mesendžers, lai aktivētu citas signālu transdukcijas kaskādes caur vienu no četriem adenozīna receptoru ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) apakštipiem. Turklāt, tā kā cAMF asinīs ir relatīvi stabils, tad ekto-enzīmi var konvertēt cirkulējošo cAMF attālā vietā, faktiski cAMF padarot par prohormonu adenozīnam (kam asinsritē ir īslaicīgs pussabrukšanas periods) (28).

### 1.6.1. cAMF bioloģiskā aktivitāte

Sirdī cAMF ir galvenais secīga uzbudinājuma-kontrakcijas regulētājs un tā bioloģiskie efekti tiek galvenokārt saistīti ar PKA aktivitāti. Ir veikts pētījums, kurā meklēta ar cAMF saistītā apmaiņas proteīna, ko tieši aktivē cAMF (Epac) loma žurkas ventrikulāro sirds miocītu kontraktilitātes īpašību regulācijā un secināts, ka gan PKA, gan Epac palielina sirds sarkomēru kontrakcijas ar pretējiem mehānismiem. Epac aktivitāte ir atkarīga no cAMF līmeņa, ko savukārt regulē adenilciklāzes un fosfodiesterāzes (PDE) (1.3. att.) (29).



1.3. att. cAMF signālceļu kaskāde (30)

Cikliskais adenozinmonofosfāts ir galvenais simpātiskās nervu sistēmas starpnieks un ir iesaistīts sirds funkcijas kontrolē. Bez cikliskā nukleotīdu elektrokardiostimulētājšūnu (*pacemaker*) kanāla, cAMF darbojas caur serīna/treonīna specifisko PKA, lai modulētu sirds kontraktilitāti ar intracelulāru  $Ca^{2+}$  pārvietošanu.  $Ca^{2+}$  ir nepieciešams sirds elektriskai aktivitātei un tieši iedarbojas uz miofilamentiem (muskulu šķiedrām), tādējādi ierosinot to kontrakcijas (31).

Ekstracelulārajam cAMF ir zināmas vairākas iedarbības uz dažādām orgānu sistēmām, ieskaitot nieru, aknu un centrālo nervu sistēmu. Dažas no šīm iedarbībām var būt tiešs vai netiešs rezultāts cAMF metabolismam līdz adenozinam ekstracelulārajā telpā („ekstracelulārais cAMF-adenozīna sigālceļš”). Hormons glikagons, ko aizkuņģa dziedzeris atbrīvo tieši portālajā asins plūsmā, izraisa intracelulārā cAMF signalizēšanu hepatocītos, un tas noved pie būtiskas cAMF noplūdes vispārējā asinsritē. Izrādās, ka cirkulējošā cAMF nozīmīgs mērķis ir nieru sistēma, īpaši proksimālie kanāliņi. Pētnieki ierosinājuši, ka no aknām atbrīvotais cAMF var darboties kā cirkulējošais faktors, kas mediē glikagona nieru efektus. Fenomens ir nosaukts par „pankreato-hepatorenālo kaskādi”. Pētījumos arī demonstrēts, ka cAMF, ieplūstot no aknām vispārējā asinsritē un sasniedzot nieres, spēj iziet enzimatiskās pārvērtības līdz adenozinam. Tādēļ iespējams cAMF, kas atbrīvots no viena šūnu tipa, var ierosināt cAMF signalizēšanu citā blakus esošā šūnā vai nomākt, atkarībā no konkrēta adenozīna receptora apakštipa īpašībām (32, 33).

### 1.6.2. *Anchoring* proteīni

Daudzos šūnu tipos cAMF līmeņa pieaugums var radīt atbildes reakciju, kas vienā šūnas daļā ir nepieciešama, bet citā nevēlama (varbūt kaitīga). Novietošanas vai angļu valodā ***Anchoring* proteīnu** ģimene lokalizē PKA izoformas specifiskās subcelulārās vietās, tādējādi ierobežojot cAMF atkarīgās atbildes reakcijas tikai šajās vietās. Šiem proteīniem, kas attiecināti kā **ar A kināzi saistītie proteīni (AKAP)**, ir divu domēnu struktūra ar vienu domēnu, kas piešķir specifisku subcelulāru vietu, un otru, kas piesaistās PKA regulatorajai apakšvienībai (34).

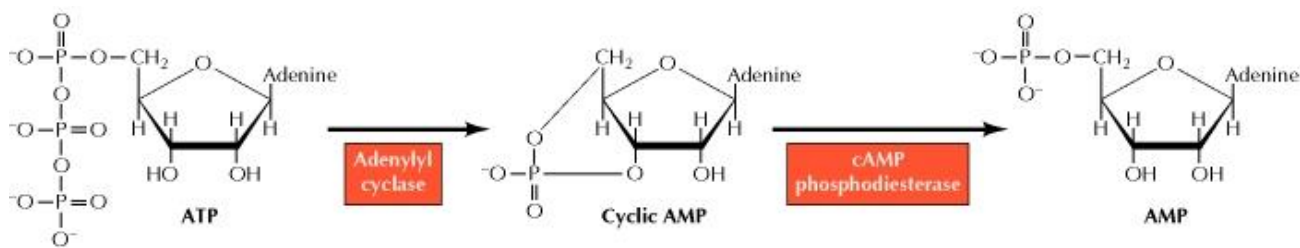
*Anchoring* proteīns15 (**AKAP15**) ir piesaistīts plazmas membrānas citozola plaknei tuvu specifiskam  $Ca^{2+}$  jonu kanāla tipam noteiktās sirds muskuļa šūnās. Sirdī epinefrīna izraisītā  $\beta$ -

adrenergisko receptoru aktivācija noved pie PKA katalizētās  $\text{Ca}^{2+}$  kanālu fosforilācijas, liekot tiem atvērties. Sekojošais  $\text{Ca}^{2+}$  influkss palielina sirds muskuļa kontrakciju ātrumu. *Anchoring* proteīna mijiedarbība ar PKA lokalizē PKA blakus  $\text{Ca}^{2+}$  jonu kanāliem, tādējādi samazinot laiku, kas citādi būtu nepieciešams PKA katalītisko apakšvienību difūzijai no to rašanās vietas līdz to  $\text{Ca}^{2+}$ -kanālu substrātam. Cits muskuļu ar A kināzi saistītais proteīns (**mAKAP**) sirds muskulī „noenkuro” gan PKA, gan **cAMF fosfodiesterāzi (FDE)** uz ārējās kodola membrānas. Tā kā FDE atrodas lielā tuvumā, tad negatīva atgriezeniskā saite nodrošina ciešu lokālu cAMF līmeņa kontroli un līdz ar to PKA aktivitāti. Proteīnkināzes A lokalizācija tuvu kodola membrānai arī atvieglo katalītisko apakšvienību ieiešanu kodolā, kur tās fosforilē un aktivē noteiktus transkripcijas faktoros (35).

### 1.6.3. Fosfodiesterāzes

Hormonu ietekmē palielinās cAMF koncentrācija, un to var samazināt vairākos veidos, tajā skaitā fosfodiesterāzēm hidrolizējot cAMF līdz 5`-AMF. Šo hidrolītisko enzīmu klātbūtne nodrošina ātru signāla (cAMF) maiņu, un tādējādi ātru bioloģiskā procesa izbeigšanu, tiklīdz nav hormonālais stimul (10). Ir zināmi vismaz 11 fosfodiesterāžu enzīmu ģimenes pārstāvji. Tos regulē to substrāti, cAMF un cGMF; hormoni; tādi intracelulārie mesendžeri kā kalcijns, iespējams darbojoties caur kalmodulīnu. Fosfodiesterāzes inhibitori, jo īpaši tādi metilētā ksantīna atvasinājumi kā kofeīns, palielina intracelulāro cAMF un tādējādi atdarina vai pagarina hormonu iedarbību (11).

Cikliskā adenozinmonofosfāta izdalīšanas mehānisms lielā mērā tiek noraidīts kā līdzeklis, kas regulē cAMF intracelulāro signālu, jo ciklisko nukleotīdu fosfodiesterāzes (FDE, enzīmi, kas sašķeļ cAMF un cGMF) nodrošina ātru un efektīvu intracelulārā cAMF kontroli (1.4. att.) (36, 37).



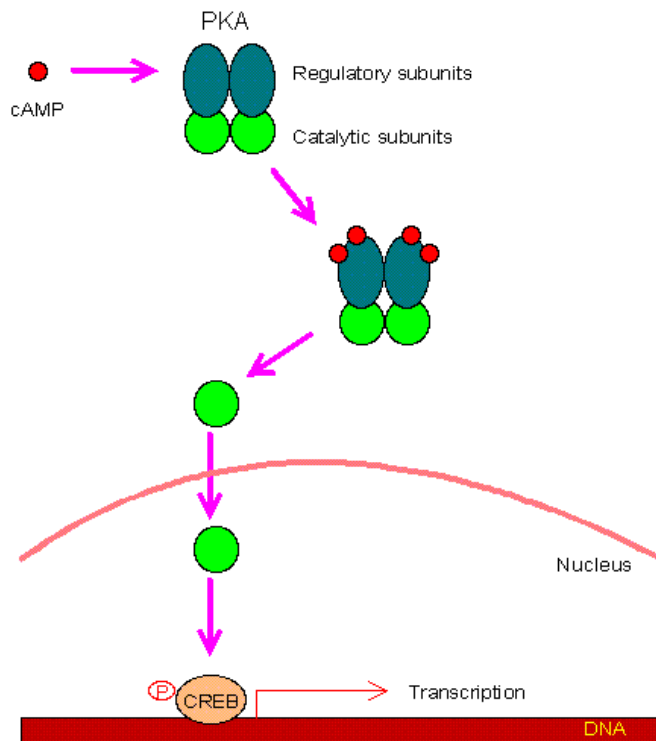
1.4. att. cAMF sintēze un sašķelšana (14)

## 1.7. Proteīnkināzes un fosfatāzes

Visu šūnas virsmas receptoru aktivācija noslēdzas tieši vai netieši ar izmaiņām proteīnu fosforilācijā, aktivējot proteīnkināzes vai proteīnu fosfatāzes. Dzīvnieku šūnas satur divu veidu proteīnkināzes: tās, kas hidroksil- grupai pievieno fosfātu uz tirozīna atlikumiem un kas fosfātu pievieno uz serīna vai treonīna (vai abu) atlikumiem. Fosfatāzes, kuras noņem fosfāta grupas, var darboties saskaņoti ar kināzēm, lai „ieslēgtu” vai „izslēgtu” dažādu proteīnu funkcijas. Cilvēka genoms kodē 500 proteīnkināzes un 100 dažādas fosfatāzes. Dažās signālceļu kaskādēs pašiem receptoriem piemīt kināzei vai fosfatāzei raksturīgā aktivitāte, bet citās receptors mijiedarbojas ar citozola vai ar membrānu saistītām kināzēm. Proteīnkināzes katalītisko aktivitāti savukārt parasti modulē citas kināzes to fosforilējot, tieša saistīšanās pie citiem proteīniem vai izmaiņas dažādu sekundāro mesendžeru līmeņos. Visu proteīnkināžu aktivitātei pretēja ir proteīnu fosfatāžu aktivitāte, ko dažām fosfatāzēm regulē arī ekstracelulārie signāli (38).

### 1.7.1. cAMF aktivētā proteīnkināze A

Prokariotiskās šūnās cAMF piesaistās specifiskam proteīnam, **katabolītu regulatorajam proteīnam (CRP)**, kas saistās tieši pie DNS un ietekmē gēnu ekspresiju. Eikariotiskās šūnās cAMF piesaistās **proteīnkināzei A (PKA)**, kas mediē gandrīz visus dažādos cAMF efektus (39). Neaktīva proteīnkināze ir tetramērs, kas sastāv no **2 regulatorām (R)** un **2 katalītiskām (K)** apakšvienībām. Katrai R apakšvienībai ir divas noteiktas cAMF saistīšanās vietas; cAMF piesaistīšanās R apakšvienībai noved pie saistītās K apakšvienības atbrīvošanas, tādējādi atklājot tās katalītisko saiti un aktivējot tās kināzes aktivitāti (1.5. att.). Nelielas izmaiņas citozola cAMF līmenī var izraisīt proporcionāli lielas pārmaiņas disociētās K apakšvienības daudzumā un tādējādi kināzes aktivitātē.



1.5. att. cAMP/PKA signālcēļi (40)

Proteīnkināzes darbības sākotnēji tika raksturotas kā „cAMP-atkarīgās” un „cAMP-neatkarīgās”, līdz kā noteicošo regulatoro mehānismu atklāja proteīnu fosforilēšanu. Tagad ir jau aprakstīti vairāki simti proteīnkināžu. Tām ir radniecīgas sekvenses un katalītiskā domēna struktūra, bet katra ir unikāla molekula ar ievērojamām atšķirībām attiecībā uz apakšvienību sastāvu, molekulāro svaru, autofosforilēšanu un substrāta specifiskumu (41).

Vairums zīdītāju šūnu ekspresē receptorus, kas saistīti ar  $G_s$  proteīnu. Šo receptoru stimulēšana ar dažādiem hormoniem noved pie PKA aktivācijas, bet no tā izrietošā šūnu atbildes reakcija ir atkarīga no specifiskas PKA izoformas un PKA substrāta, ko ekspresē šūna. Kā piemēru var minēt epinefrīna ietekmi uz glikogēna metabolismu, ko mediē cAMP, PKA un kas tiek galvenokārt saistīta ar aknu un muskuļu šūnām, kuras ekspresē enzīmus glikogēna ražošanai un sadalīšanai (42).

Adipozās šūnās epinefrīna ierosinātā PKA aktivācija veicina fosfolipāzes fosforilāciju un aktivāciju, kas katalizē uzglabāto triglicerīdu hidrolīzi līdz brīvajām taukskābēm un glicerīnam. Šīs taukskābes tiek atbrīvotas asinīs un izmantotas kā enerģijas avots citu audu šūnās, piemēram, nierēs, sirdī un muskuļos. Līdzīgi ar G proteīnu saistīto receptoru stimulēšana uz

olnīcu šūnām ar noteiktiem hipofīzes hormoniem noved pie PKA aktivācijas. Tas savukārt sekmē divu steroīdo hormonu, estrogēna un progesterona, sintēzi, kas ir būtiski sieviešu dzimuma īpašību attīstībā. Kaut gan PKA darbojas uz dažādiem substrātiem atšķirīgos šūnu tipos, tā vienmēr fosforilē serīna vai treonīna atlikumu, kas notiek vienā un tajā pašā sekvences motīvā: X-Arg-(Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)-Φ, kur X apzīmē jebkuru aminoskābi un Φ apzīmē hidrofobu aminoskābi. Citas serīna/treonīna kināzes fosforilē mērķa atlikumus atšķirīgos sekvences motīvos (43).

### 1.7.2. PKA aktivācija regulē glikogēna metabolismu

Pirmā atklātā cAMF mediētā šūnu atbildes reakcija bija glikozes atbrīvošana no glikogēna, kas notiek muskuļu un aknu šūnās, ko stimulē epinefrīns vai citi hormoni, kuru receptori ir saistīti ar G<sub>s</sub> proteīnu. Šī atbildes reakcija demonstrē, kā PKA aktivācija var koordinēt intracelulāru enzīmu grupas aktivitāti uz kopīgu mērķi. **Fosfoproteīnu fosfatāzi** arī regulē PKA. Aktivētā PKA fosforilē fosfoproteīnu fosfatāzes inhibitoru; fosforilētais inhibitors pēc tam saistās pie fosfoproteīnu fosfatāzes, inhibējot tās aktivitāti. Pie zema cAMF līmeņa, kad PKA ir neaktīva, inhibitors nav fosforilēts un fosfoproteīnu fosfatāze ir aktīva. Tā rezultātā glikogēna sintāzes veiktā glikogēna sintēze tiek palielināta un glikogēna fosforilāzes glikogēna degradācija tiek inhibēta. Ar G proteīnu saistīto receptoru ierosinātās šūnu atbildes reakcijas, kas aktivē adenilciklāzi, var prasīt desmitiem tūkstošu vai pat miljonu cAMF molekulu uz šūnu (11).

### 1.8. CREB proteīns

Tiek uzskatīts, ka visus cAMF efektus eikariotiskās šūnās mediē proteīnu fosforilēšana-defosforilēšana, galvenokārt uz serīna un treonīna atlikumiem (44). Ikvienu cAMF efektu, ieskaitot tādus atšķirīgus procesus kā steroīdģenēze, sekrēcija, jonu transports, ogļhidrātu un tauku metabolisms, gēnu regulācija, sinaptiskā signālu pārnese, šūnu augšana un replikācija var kontrolēt ar specifisku proteīnkināzi, fosfatāzi vai fosforilēšanas substrātiem. Šie substrāti palīdz definēt mērķa audus un ir iesaistīti konkrētas atbildes reakcijas apjoma noteikšanā dotajā šūnā. Piemēram, cAMF iedarbību uz gēnu transkripciju mediē **cAMF atbildes element-saistošais**



atbrīvošanu no keratinocītu un fibroblastu kultūrām, kas ņemtas no normālas cilvēka ādas. Iegūtie rezultāti apstiprināja, ka db-cAMF dziedējošais efekts uz ādas čūlām ir daļēji izskaidrojams ar citokīnu sekrēcijas un šūnu proliferācijas stimulāciju. Dibutiril-cAMF veicināja keratinocītu proliferāciju, palielinot fibroblastos interleikīna-6 (IL-6) un transformējošā augšanas faktora – beta1 (TGF- $\beta$ 1) produkciju (49).

Savukārt citā pētījumā db-cAMF tika izmantots, lai, mainot *in vitro* signālu transdukcijas apkārtējo vidi, palielinātu cilvēka mezenhimālo cilmes šūnu (MSC) kaulu veidošanos. Novērojums, ka cilvēka MSC cAMF/PKA signālceļu kaskādes aktivēšana *in vitro* ietekmē kaulu formāciju, *in vivo* savukārt demonstrē, ka izvēlētās šūnu barotnes piedevas var iespaidot priekšteču šūnu diferenciaciju vēlāk (50).

**Forskolīns** darbojas aktivizējot enzīmu adenilciklāzi un palielinot cAMF intracelulāros līmeņus. Līdzīgu efektu uzrāda ar G proteīnu saistīto receptoru (GPCR) ligandi, ja tie saistās pie ar G<sub>s</sub> proteīnu saistīta receptora (51). Augšanas faktori var gan stimulēt, gan bloķēt cAMF sintēzi. Sinerģiju starp forskolīnu un augšanas faktoriem ataino sialoproteīna ekspresēšana (52), dopamīnerģisko neironu radīšana no cilvēka fetālām vidussmadzeņu nervu priekšteču šūnām (53) un adipozās izcelsmes cilmes šūnu diferencēšanās Švāna šūnu fenotipā (54). Starp **fibroblastu augšanas faktoru (FGF)** un cAMF ir aprakstīta arī antagonistiska saistība. To apliecina eksperiments, kurā FGF stimulēja mitogēnēzi žurku vairogdziedzera *Fischer Rat Thyroid Low Serum 5%* (FRTL-5) un hipofīzes GH<sub>3</sub> šūnās, bet samazināja cAMF līmeni (55).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

### 2.1. Aparatūra un izmantotie trauki

#### Aparatūra:

- Laboratorijas svāri, Boeco, Vācija, ar precizitāti  $\pm 0,01$  g
- *Biosan* centrifūga līdz 6000 apgr/min
- Magnētiskais maisītājs (*Biosan*, Latvija)
- ELISA mikroplašu lasītājs (*BioTek*)
- Mikroplašu datu analīzes programmatūra Gen5 (*BioTek*)
- Mikroskops (*Leica*)
- Hematocitometrs

#### Mērtrauki (B precizitātes klase, Vācija):

- Mērcilindri 50, 150 ml
- 8 kanālu pipetes (5-50  $\mu$ l un 50-300  $\mu$ l)
- 96-lauciņu un 24-lauciņu plates (*Sardstedt*)
- Mēģenes dažāda tilpuma un *Ependorph*
- Šūnu kultūru trauki (*Costar*)

#### Reāģenti

- Šūnu barotņu vide, reāģenti un materiāli tika iepirkti no *Invitrogen* (Lielbritānija) un *Sigma-Aldrich* (ASV), *Sarstedt* (Vācija).
- Cell counting Kit-8 (CCK-8) tika iegādāts no *Fluka* (Šveice).
- cAMF noteikšanas kits kataloga Nr. KG002 tika iegādāts no *R&D Systems* (Lielbritānija).
- CREB ELISA kits kataloga Nr. CBA071 tika iegādāts no *Calbiochem*, *Merck Biosciences* (Lielbritānija).

## 2.2. Eksperimentos pētītās vielas

- Dibutiril-cAMF (db-cAMF) un forskolīns tika iegādāti no Sigma-Aldrich (ASV).
- Augšanas faktors FGF-2 un epidermālais augšanas faktors (EGF) tika iegādāti no R&D Systems (Lielbritānija).
- Leikēmijas inhibitorais faktors (LIF) tika iegādāts no Chemicon International (Vācija).
- B27 piedeva tika iepirkta no Invitrogen (Lielbritānija).

## 2.3. Šūnas

Izmantotas 8 cilvēku dermas cilmes šūnas, kuras saņemtas no LU Bioloģijas fakultātes Bioanalītisko metožu laboratorijas (vad., Dr. biol. Jānis Ancāns) un audzētas šajā laboratorijā barotnē DMEM/F12 (attiecībā 3:1) ar 10% teļa serumu (Invitrogen) un penicilīnu, un streptomicīnu (100 U/ml un 100 µg/ml; Invitrogen).

Eksperimentiem tika izmantotas cilvēka dermas cilmes šūnas ar kodiem 01D, 06D, 07D, 10D, 11D, 23D, 26D un 27D.

### Šūnu kultūru audzēšana:

- 1) Šūnas audzē šūnu CO<sub>2</sub> inkubatorā 37°C 25 cm<sup>2</sup> šūnu kultūru traukos (Costar) ar 90% mitruma un 5% CO<sub>2</sub>.
- 2) Šūnu augšanu novēro ar mikroskopu (Leica).
- 3) Sasniedzot 100% konfluenci, piestiprinājušās šūnas tripsinizē ar 0,25% tripsīna/EDTA maisījumu (Invitrogen) 2 min. pie 37°C, reakciju apstādina, pievienojot 0,5 ml teļa seruma vai tripsīna inhibitora (Invitrogen).
- 4) Iegūto šūnu suspensiju centrifugē 5 min. pie 1500 rpm un atsūc šķidrumu.
- 5) Nogulsnes resuspendē 5 ml tilpumā jaunā barotnē.

Šūnas saskaita ar mikroskopa palīdzību hematocitometrā. Turpmākiem eksperimentiem šūnas pārsēj 96-lauciņu platēs 5000 šūnu lauciņā un 24-lauciņu platēs DMEM/F12 barotnē ar 0,5% FBS 200 000 šūnu 1 lauciņā (cAMF un CREB līmeņa mērījumiem). Pēc 24 h sagatavo

eksperimentam dažādas barotnes, kuras pievieno cilmes šūnu līnijām. Kontroles šūnām nepievieno pētāmās vielas un tās kalpo kā kontrole. 0.5% FBS nodrošina šūnu pieķeršanos platei, un veicina šūnu dalīšanās cikla sinhronizēšanu, bet augšanas faktoru efektu novērtēšanai eksperimenta lauciņos šūnas audzē barotnē bez seruma ar augšanas faktoriem (kods FEB) (2.1. tab.). FEB ir bez seruma pamatbarotne. Otra bez seruma barotne ir ar kodu FEB+LIF (leikēmijas inhibitorais faktors) ar koncentrāciju 10 ng/ml, bet trešai bez seruma barotnei kods ir FEBIT, jo FEB barotne papildināta ar insulīnu (25 µg/ml) un transferīnu (100 µg/ml). Šūnu barotņu piedevas izvēlētas tādas, kādas minētas zinātniskajā literatūrā (56, 57, 58). Barotnes pievieno 0,15 ml 96-lauciņu plates katrā lauciņā un 0,45 ml 24-lauciņu plates katrā lauciņā.

2.1. tabula

**Šūnu barotņu sastāvs**

	<b>Kontroles barotne</b>	<b>FEB</b>
1.	DMEM 3 daļas	DMEM 3 daļas
2.	F12 1 daļa	F12 1 daļa
3.	0,5% liellopu asins serums (FBS)	-
4.		B27 piedeva 10%
5.		Fibroblastu augšanas faktors 2 (FGF-2) 20 ng/ml
6.		Epidermālais augšanas faktors (EGF) 10 ng/ml

Pēc pārsēšanas šūnu plates ievieto šūnu audzēšanas 37°C inkubatorā ar 90% mitruma un 5% CO<sub>2</sub> un turpina audzēt vēl 24 h vai 72 h atbilstošās barotnēs līdz izmanto eksperimentiem.

## 2.4. Šūnu proliferācijas mērīšana

Šūnu proliferācija tika mērīta ar kitu Cell Counting Kit-8 (CCK-8), kas paredzēts precīzas kolorimetriskās metodes veikšanai, lai noteiktu dzīvotspējīgo šūnu skaitu šūnu proliferācijas un citotoksicitātes testos. CCK-8 reaģents satur šūnu dzīvotspējai nekaitīgu tetrazolija sāli WST-8, kuru reducē dzīvo šūnu dehidrogenāzes par dzeltenas krāsas formazānu, kas ir šķīstošs audu barotnē. Šūnu dehidrogenāzes aktivitātes radītais formazāna krāsojuma daudzums ir tieši proporcionāls dzīvo šūnu skaitam. 96-lauciņu platēs augošās šūnas stimulē ar db-cAMF koncentrācijās 0,5 mM un 1 mM. Mēs pētījām arī augšanas faktoru ietekmi uz šūnu proliferāciju. Pētījām FGF (fibroblastu augšanas faktors), EGF (epidermālais augšanas faktors), B27 piedevas, LIF (leikēmijas inhibitorais faktors), insulīna, transferīna efektus uz šūnu proliferāciju no dermas (01D, 06D, 07D, 10D, 11D, 23d, 26D un 27D) izolēto cilmes šūnu FEB barotnēs pēc 3 dienu stimulācijas.

Pēc 72 h šūnām pievieno 10  $\mu$ l CCK-8 reaģenta un plati inkubē 2-4 h (vidēji 3 h) šūnu inkubatorā. Absorbciju mēra pie 450 nm viļņa garuma. Šūnu skaitu aprēķina pēc zināma šūnu skaita standartlīknes OD. Visus eksperimentus atkārtu trīs reizes ar 2-4 paralēliem mērījumiem.

## 2.5. cAMF līmeņa noteikšana

Cikliskā adenozinmonofosfāta koncentrācijas noteikšanai šūnas audzē 24-lauciņu platēs pa 200 000 šūnām vienā lauciņā. Tad no šīm šūnām pagatavo lizātu, kuru atšķaida atbilstoši kita instrukcijai un pievieno jau ar antivielām pārklātā, darbam sagatavotā 96-lauciņu platē. cAMF koncentrācijas noteikšanai izmanto R&D Systems kitu KGE002 cAMF mērījumiem šūnu kultūru supernatantos, serumā, plazmā, siekalās, urīnā un šūnu lizātos. Metode pamatojas uz cAMF konkurento saistīšanos ar monoklonālām antivielām specifiskām pret cAMF, pie kurām ir pievienots fiksēts daudzums mārrutku peroksidāzes (HRP). Inkubēšanas laikā 96-lauciņu platēs monoklonālās antivielas saistās ar kaza anti-pele antivielām, ar kurām ir pārklāta plate. Nepiesaistīto paraugu un neizmantoto konjugātu nomazgā ar fosfātu un nātrija hlorīda (PBS) buferšķīdumu ar pH 7.4, pievieno substrāta šķīdumu un pēc krāsas nolasa piesaistītā enzīma aktivitāti pie 450 nm. Krāsas intensitāte ir tieši proporcionāla cAMF koncentrācijai paraugos.

cAMF daudzumu pārrēķina pmol/mg proteīna. Visus eksperimentus atkārtoti trīs reizes ar 2 paralēliem mērījumiem.

### **Šūnu šķīdināšana (lizātu sagatavošana):**

1. Šūnām atsūc barotni.
2. Trīs reizes aukstā PBS buferšķīdumā, pH 7.4, nomazgā šūnas no barotnes klātbūtnes.
3. Šūnas resuspendē šūnu lizēšanas buferšķīdumā (Cell Lysis Buffer 5 (1x)) līdz koncentrācijai apmēram 10 miljonu šūnu 1 ml.
4. Sasaldē šūnu šķīdumu pie  $-20^{\circ}\text{C}$  un atkausē vairākas reizes.
5. Mikroskopā kontrolē šūnu pilnīgu izšķīšanu, iekrāsojot ar tripānzilo.
6. Šūnu šķīdumu no platēm pārnes Ependorph mēģenēs un centrifugē 600 x g, apmēram 10 min.,  $2-8^{\circ}\text{C}$  temperatūrā.
7. Līdz tālākai apstrādei lizātus var uzglabāt ledusskapī.

### **Reaģentu pagatavošana**

- *Mazgāšanas buferšķīdums*

Lai pagatavotu 500 ml mazgāšanas buferšķīduma, 480 ml destilēta ūdens izšķīdināja 20 ml mazgāšanas PBS buferšķīduma koncentrāta.

- *Šūnu lizēšanas buferšķīdums 5 (1x)*

Lai pagatavotu 50 ml šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x), 40 ml destilēta ūdens izšķīdināja 10 ml šūnu lizēšanas buferšķīduma 5.

- *Substrāta šķīdums*

Iemērīja 10 ml krāsu reaģenta A ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) un 10 ml krāsu reaģenta B (tetrametilbenzidīna), sajauc abus reaģentus kopā, attiecībā 1:1.

- *cAMF standartšķīdums*

Liofilizētu cAMF standartu izšķīdināja 1 ml destilēta ūdens, lai iegūtu 2400 pmol/ml pamatšķīdumu (*stock*). Pēc tam, viegli sakratot, ļāva tam vismaz 15 min. nostāvēties pirms atšķaidījumu pagatavošanas.

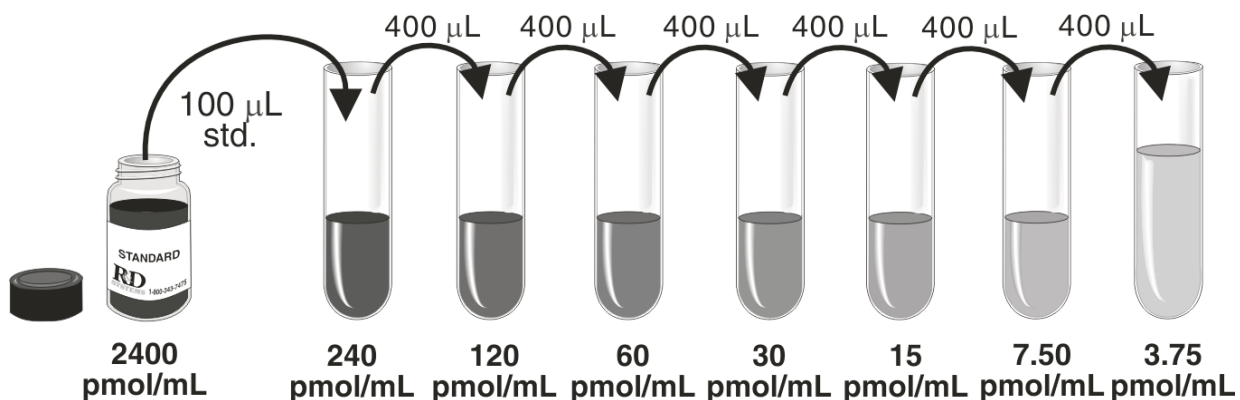
## cAMF standartšķīduma atšķaidīšana

Atšķaida pēc kita instrukcijām cAMF pamatšķīdumu (*stock*) (2.1. att.).

- *Standarta atšķaidījumu pagatavošana:*

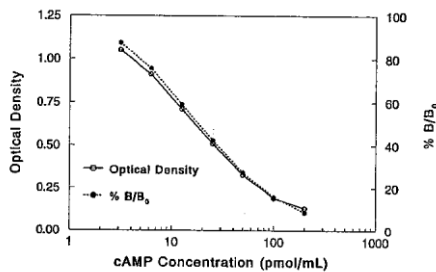
Gatavoja 7 cAMF standartšķīduma atšķaidījumus, ar sākotnējo koncentrāciju 2400 pmol/ml, vienmērīgu vielu sajaukšanos nodrošināja, izmantojot magnētisko maisītāju.

1. Atšķaidījums ar koncentrāciju 240 pmol/ml. Iemērīja 100  $\mu$ l sākotnējās koncentrācijas Standartšķīduma un atšķaidīja ar 900  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).
2. Atšķaidījums ar koncentrāciju 120 pmol/ml. Iemērīja 400  $\mu$ l iepriekšējās (240 pmol/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 400  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).
3. Atšķaidījums ar koncentrāciju 60 pmol/ml. Iemērīja 400  $\mu$ l iepriekšējās (120 pmol/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 400  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).
4. Atšķaidījums ar koncentrāciju 30 pmol/ml. Iemērīja 400  $\mu$ l iepriekšējās (60 pmol/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 400  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).
5. Atšķaidījums ar koncentrāciju 15 pmol/ml. Iemērīja 400  $\mu$ l iepriekšējās (30 pmol/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 400  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).
6. Atšķaidījums ar koncentrāciju 7,50 pmol/ml. Iemērīja 400  $\mu$ l iepriekšējās (15 pmol/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 400  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).
7. Atšķaidījums ar koncentrāciju 3,75 pmol/ml. Iemērīja 400  $\mu$ l iepriekšējās (7,50 pmol/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 400  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x).



2.1. att. cAMF standartu atšķaidījumi (kita instrukcija)

Atbilstoši kita instrukcijām cAMF standartlīkne šajā koncentrāciju intervālā ir lineāra (2.2. att.).



2.2. att. Kita instrukcijā parādītā standartlīkne

### cAMF koncentrācijas mērīšana šūnu šķīdumos (lizātos):

1. Sagatavo plati un darba šķīdumus kā rakstīts kita instrukcijā.
2. Pieliek 150  $\mu$ l šūnu lizēšanas buferšķīduma 5 (1x) nespecifiskās saistīšanās (NSB) lauciņos un 100  $\mu$ l B<sub>0</sub> lauciņos. Tie kalpo kā reaģentu kontrole.
3. Pieliek 100  $\mu$ l cAMF standartšķīduma ar zināmu koncentrāciju vai nezināmo eksperimentālo paraugu. Šūnas iepriekš izšķīdina un izmanto šūnu lizātus.
4. Pieliek 50  $\mu$ l (izņemot nespecifiskos NSB lauciņus) primāro antivielu šķīduma. Paraugi iekrāsojas zilā krāsā.
5. Pievieno 50  $\mu$ l cAMF konjugāta. Visi lauciņi, izņemot NSB, iekrāsojas violeti.
6. Plati pārklāj ar vāciņu un inkubē 3 h istabas temperatūrā uz kratītāja 500 rpm.
7. Nolej šķidrumu no šūnām, mazgā ar PBS buferšķīdumu 3 reizes. Apgāž plati uz papīra dvieļa un ļauj platei pažūt.
8. Pieliek 200  $\mu$ l substrāta šķīduma. Inkubē 30 min. istabas temperatūrā tumšā vietā.
9. Pieliek 50  $\mu$ l *Stop* šķīduma (0.5-2 N sērskābe). Krāsa nomainās uz dzeltenu.
10. 30 min. laikā plati nolasa ELISA mikroplašu lasītājā pie 450 nm.

Pēc standartlīknes datorprogrammā Gen5 aprēķina cAMF koncentrāciju paraugos.



2.3. att. 24-lauciņu mikroplate

## 2.6. Forskolīna efektu pētīšana

1. Nosver uz analītiskajiem svāriem precīzu daudzumu forskolīna un pagatavo 100 mM šķīdumu apmēram 1 ml. Forskolīna molmasa ir 410,5. Forskolīnu izšķīdina 2% etanola-ūdens šķīdumā, kuru atšķaida 10 reizes ar attiecīgo šūnu kultūru barotni un iegūst 10 mM šķīdumu, kuru pievieno šūnām 50  $\mu$ l pie 450  $\mu$ l barotnes 24-lauciņu platē (2.3. att.) vēlreiz iegūstot 10x atšķaidījumu uz šūnām. Tas ir 1 mM. Atšķaidot 100 mM koncentrātu 100x, iegūstam 1 mM šķīdumu, kuru vēlreiz atšķaida uz pusi 1:1 ar attiecīgo barotni - iegūst 0,5 mM šķīdumu, kuru pievieno 50  $\mu$ l pie 450  $\mu$ l barotnes un 24-lauciņu platē vēlreiz iegūst 10x atšķaidījumu uz šūnām. Tas ir 0,05 mM.

2. Šūnas stimulē ar forskolīnu koncentrācijās 0,05 mM un 1 mM, 20 min., turot 24-lauciņu plates šūnu inkubatorā. Tad vispirms šūnas lizē un atbilstoši kita KGE002B instrukcijai, nosaka cAMF līmeni šūnu lizātos, izmantojot 96-lauciņu plati, kas ir jau pārklāta ar antivielām. Salīdzina forskolīna efektus 8 dermas cilmes šūnu līnijās uz cAMF producēšanos 0,5% FBS barotnē un FEB barotnē. Visus eksperimentus atkārtoti trīs reizes ar diviem paralēliem mērījumiem.

## 2.7. Totālā CREB proteīna noteikšana

Šūnas audzē noteiktu laiku 24- lauciņu platēs 200 000 šūnas lauciņā. No šūnu kultūras pagatavo lizātu. Proteīna CREB daudzumu šūnu lizātos mēra ar mikroplašu mērījumiem sagatavotu kolorimetrisko metodi 96-lauciņu platē, izmantojot kitu CREB ELISA (Calbiochem CREB ELISA kit Cat. No CBA071). Metode balstās uz CREB konkurento saistīšanos ar monoklonālām antivielām specifiskām pret totālo CREB, kuras saista CREB antigēnu. Inkubēšanas laikā 96-lauciņu platēs monoklonālās antivielas saistās ar mārrutku peroksidāzes (HRP) iezīmētām anti-truša IgG antivielām, ar kurām ir pārklāta plate. Pievieno substrāta šķīdumu un pēc krāsas ar ELISA mikroplašu lasītāju nolasa OD pie 450 nm, kas atspoguļo piesaistītā enzīma aktivitāti. Krāsas intensitāte ir tieši proporcionāla CREB koncentrācijai paraugos. CREB koncentrāciju aprēķina pēc standartlīknes.

### Reāģentu pagatavošana

- *Anti-truša IgG mārrutku peroksidāze (HRP)*

10 µl 100x kocerētā šķīduma izšķīdināja 1 ml HRP šķīdinātāja katrai 8 lauciņu rindai.

- *Mazgāšanas buferšķīdums*

Mazgāšanas buferšķīduma koncentrātu 25x sajauc ar destilētu ūdeni attiecībā 1:24, uzglabā ledusskapī.

- *CREB standartšķīdums*

Liofilizētu CREB standartu izšķīdināja standarta šķīdinātāja buferšķīdumā (*Standard Diluent Buffer*). Pēc tam, viegli sakratot, ļāva tam vismaz 10 min. nostāvēties pirms atšķaidījumu pagatavošanas.

### CREB standartšķīduma atšķaidīšana

Atšķaida pēc kita instrukcijām CREB standartšķīdumu.

- *Standarta atšķaidījumu pagatavošana:*

Gatavoja 6 CREB standartšķīduma atšķaidījumus, ar sākotnējo koncentrāciju 10 ng/ml, vienmērīgu vielu sajaukšanos nodrošināja, izmantojot magnētisko maisītāju.

1. Atšķaidījums ar koncentrāciju 5 ng/ml. Iemērīja 0,25 ml sākotnējās koncentrācijas Standartšķīduma un atšķaidīja ar 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.
2. Atšķaidījums ar koncentrāciju 2,5 ng/ml. Iemērīja 0,25 ml iepriekšējās (5 ng/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.
3. Atšķaidījums ar koncentrāciju 1,25 ng/ml. Iemērīja 0,25 ml iepriekšējās (2,5 ng/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.
4. Atšķaidījums ar koncentrāciju 0,625 ng/ml. Iemērīja 0,25 ml iepriekšējās (1,25 ng/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.
5. Atšķaidījums ar koncentrāciju 0,312 ng/ml. Iemērīja 0,25 ml iepriekšējās (0,625 ng/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.
6. Atšķaidījums ar koncentrāciju 0,156 ng/ml. Iemērīja 0,25 ml iepriekšējās (0,312 ng/ml) koncentrācijas šķīduma un atšķaidīja ar 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.
7. Reaģentu kontrolei iemērīja 0,25 ml standarta šķīdinātāja buferšķīduma.

#### **CREB koncentrācijas mērīšana šūnu šķīdumos (lizātos):**

1. Pieliek 100 µl standarta šķīdinātāja nulles lauciņos un 100 µl standarta, parauga vai kontroles atbilstošos lauciņos. Plati nosedz un inkubē istabas temperatūrā uz 2 h. Nolej šķidrumu no šūnām, mazgā ar mazgāšanas buferšķīdumu 4 reizes.
2. Pieliek 100 µl anti-truša IgG-HRP (izņemot hromogēna lauciņus). Plati nosedz un inkubē istabas temperatūrā uz 30 min. Mazgā kā 1. punktā, pēc pēdējās mazgāšanas reizes plati apgriez otrādi uz tīra papīra dvieļa, ļaujot notecēt šķidrumam.
3. Pieliek 100 µl stabilizēta hromogēna visos lauciņos primāro antivielu šķīduma. Paraugi iekrāsojas zilā krāsā. Plati šoreiz nenosedz un inkubē istabas temperatūrā uz 30 min. tumšā vietā.
4. Pieliek 100 µl *Stop* šķīduma ( 0.5-2 N sērskābe) visos lauciņos. Krāsa nomainās uz dzeltenu.
5. 2 h laikā plati nolasa ELISA mikroplašu lasītājā pie 560 nm.

## 2.8. Totālā proteīna daudzuma noteikšana

Lai varētu pārrēķināt cAMF un CREB proteīna daudzumu uz 1 mg totālā proteīna šūnu masā, nosaka totālo proteīna daudzumu attiecīgi sagatavotajos un atbilstošo eksperimentu šūnu lizātos. Proteīnu koncentrāciju noteicām ar kitu *Protein ready-to-use microtiter plate assay kit for the colorimetric detection of proteins was purchased from BioChemika* (Zviedrija). Kā standartu izmantojām liellopa seruma albumīnu (BSA) atšķaidījumos 1:2, sākot no 1 mg/ml. Visus eksperimentus atkārtojām trīs reizes ar paralēliem mērījumiem.

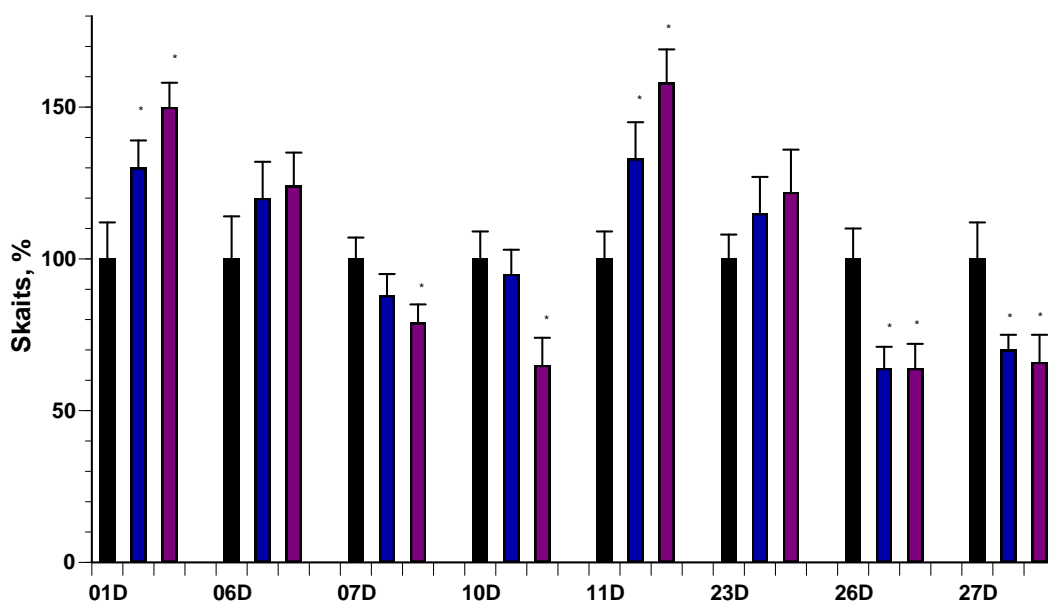
## 2.9. Datu statistiskā analīze

Iegūtie dati tika aprēķināti kā vidējie aritmētiskie lielumi  $\pm$  standartnovirze (SD). Statistiskajā analīzē tika izmantota Graph Pad Prism (GraphPad Software). Ticamību noteica ar Stjudenta t-testu vai vienfaktora testu (ANOVA) ar tam sekojošu Bonferroni testu. Rezultāti tika uzskatīti par ticamiem, ja  $p$  vērtība ir mazāka par 0,05.

### 3. REZULTĀTI

#### 3.1. Db-cAMF un augšanas faktoru efekti uz šūnu proliferāciju

Cikliskā adenozinmonofosfāta analoga db-cAMF pievienošana šūnu barotnei (DMEM/F12 ar 0.5% FBS) koncentrācijās 0,5 mM un 1 mM astoņu donoru dermas cilmes šūnu līnijām izraisīja atšķirīgus efektus. Pēc 72 h mēs novērojām gan stimulējošu, gan inhibējošu db-cAMF iedarbību uz šūnu proliferāciju (3.1.1. att.). Tomēr no koncentrācijas atkarīgu proliferācijas stimulāciju varēja redzēt tikai divām donoru šūnu līnijām (01D un 11D). 06D un 23D šūnu līnijām db-cAMF ietekme bija nenozīmīga. Savukārt 26D un 27D donoru cilmes šūnu līnijām db-cAMF inhibēja proliferāciju, bet 07D un 10D tas statistiski ticami izpaudās tikai lielākajā – 1 mM dibutiril-cAMF koncentrācijā.



##### 3.1.1. att. Db-cAMF efekti uz šūnu proliferāciju

Melnie stabiņi – kontrole bez db-cAMF, barotne ar 0,5% FBS;

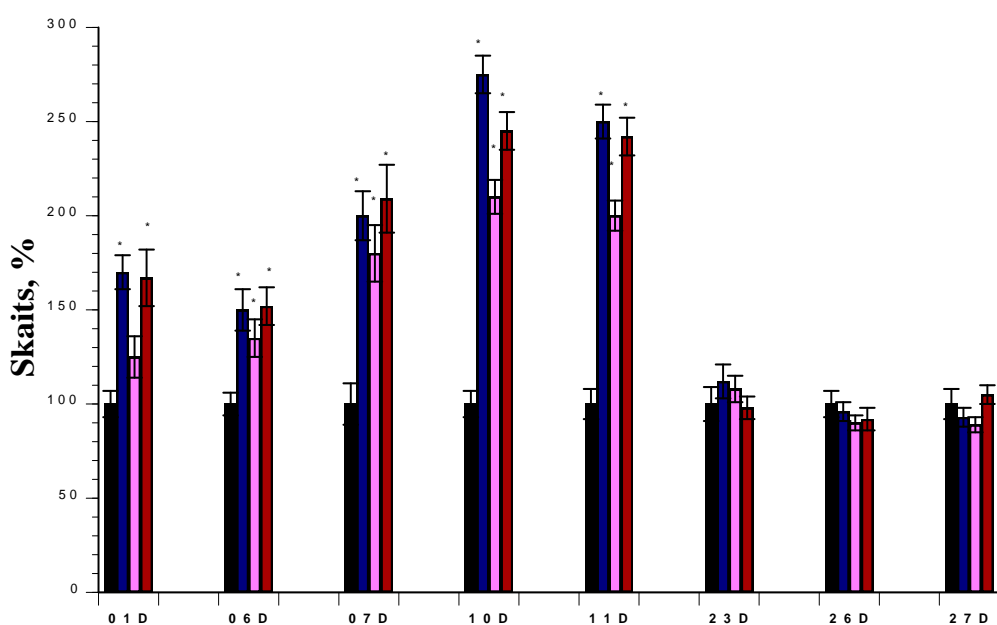
Zilie stabiņi – db-cAMF 0,5 mM;

Violetie stabiņi – db-cAMF 1 mM;

\*  $P \leq 0.05$  vs. attiecīgo šūnu kontrole

Eksperimenti atkārtoti 3 reizes ar 2-4 paralēliem mērījumiem.

Mēs pētījām šūnu proliferāciju ietekmējošo augšanas faktoru: FGF (fibroblastu augšanas faktors), EGF (epidermālais augšanas faktors), B27 piedeva, LIF (leikēmijas inhibitorais faktors), insulīna, transferīna efektus uz šūnu proliferāciju pēc 3 dienu stimulācijas. Novērojām, ka augšanas faktori piecām šūnu līnijām (1D, 6D, 7D, 10D, 11D) stimulēja šūnu proliferāciju. To novēroja FEB barotnē un FEB barotnē ar insulīna un transferīna pievienošanu, bet papildus LIF pievienošana FEB barotnei samazināja proliferāciju 01D, 10D un 11D šūnām. Kā var redzēt 3.1.2. attēlā, tad trīs šūnu līnijām augšanas faktoru pievienošana neizmainīja šūnu proliferāciju (23D, 26D un 27D).



### 3.1.2. att. Augšanas faktoru efekti uz šūnu proliferāciju

Melnā krāsā – FBS 0,5% kontrole;

Zilā krāsa – FGF (fibroblastu augšanas faktors), EGF (epidermālais augšanas faktors) un B27 piedeva (FEB barotne);

Violetā krāsa – FEB pus LIF (leikēmijas inhibitorais faktors);

Sarkanā krāsa – FEB plus insulīns 25 µg/ml, transferīns 100 µg/ml;

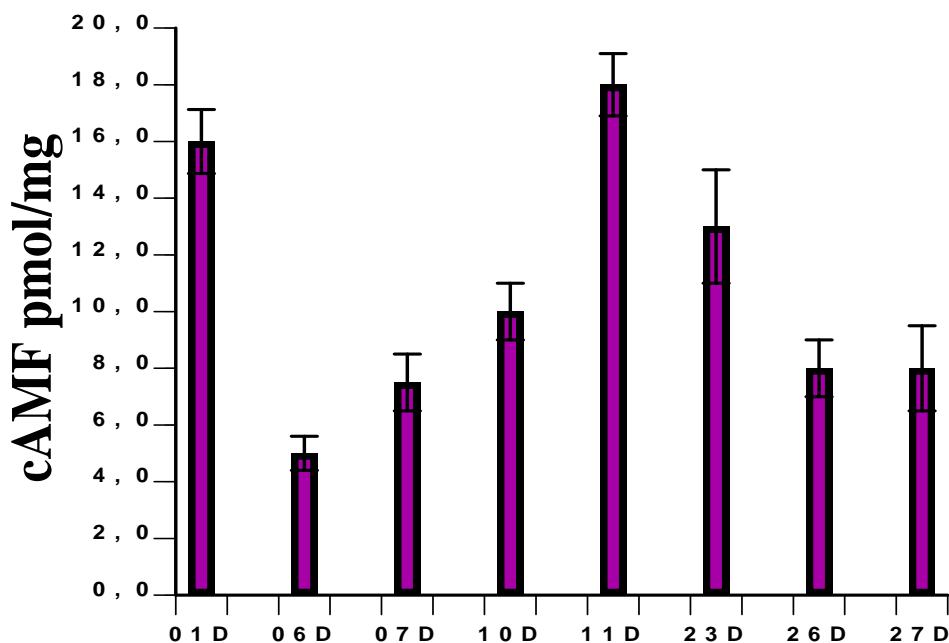
\*  $P \leq 0.05$  vs. attiecīgo šūnu kontrole ar FBS pieņemta par 100%

Eksperimenti atkārtoti 3 reizes ar 2-4 paralēliem mērījumiem.

### 3.2. Bazālā cAMF līmeņa svārstības dažādu donoru šūnu līnijās

Pieļaujot, ka šūnu līnijas atšķirīgi reaģē uz dažādu aģentu stimulāciju atkarībā no to signālmolekulu aktivitātes, katrai donoru cilmes šūnu līnijai atsevišķi noteicām bazālo cAMF līmeni. Patiešām, mērot cAMF līmeni šūnu lizātos, novērojām donoru šūnu atšķirības cAMF bazālajā līmenī. Piemēram, 06D šūnu līnijā iegūtais cAMF daudzums atšķiras četras reizes no 11D cAMF līmeņa. Kā redzams 3.2. attēlā, cAMF līmeņa svārstības starp donoru šūnu līnijām bija sākot no 5 pmol/mg līdz 18 pmol/mg. 01D un 11D šūnu līnijas uzrādīja visaugstāko cAMF koncentrāciju šūnu lizātos. Šīs šūnas arī atbildēja uz db-cAMF stimulāciju no koncentrācijas atkarīgā veidā un db-cAMF šajās kultūrās stimulēja proliferāciju.

Šūnu līnijas ražo cAMF sekojoši:  $11D \geq 01D > 23D \geq 10D \geq 26D \geq 27D > 06D$ .

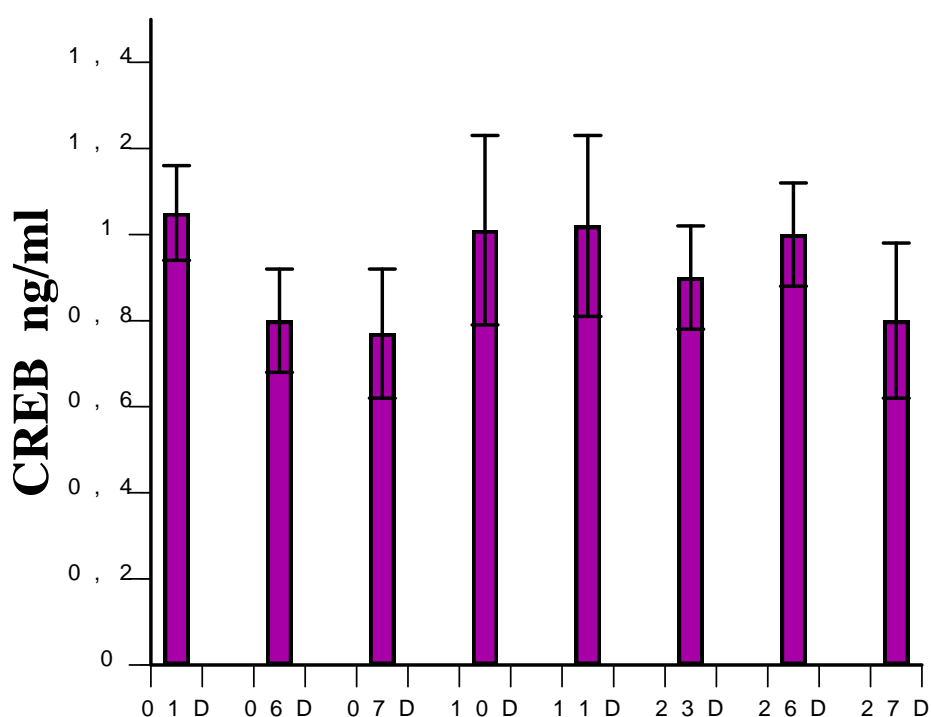


3.2. att. Bazālais cAMF līmenis dažādu donoru šūnu līnijās

Eksperimenti atkārtoti 3 reizes ar paralēliem mērījumiem.

### 3.3. Totālā (neaktivētā plus aktivētā) CREB līmeņi dažādu donoru šūnu līnijās

Mērot kopējā jeb totālā CREB daudzumu šūnās, atklājām, ka nav statistiski ticamas atšķirības starp dermas cilmes šūnām no dažādiem donoriem. Tātad 3.3. attēlā ir novērojamas mazākas svārstības CREB līmenī dažādu donoru šūnu līnijās, salīdzinot ar diezgan mainīgo bazālo cAMF līmeni. Totālā CREB daudzums visās šūnu līnijās bija aptuveni no 0,8 ng/ml līdz 1 ng/ml.



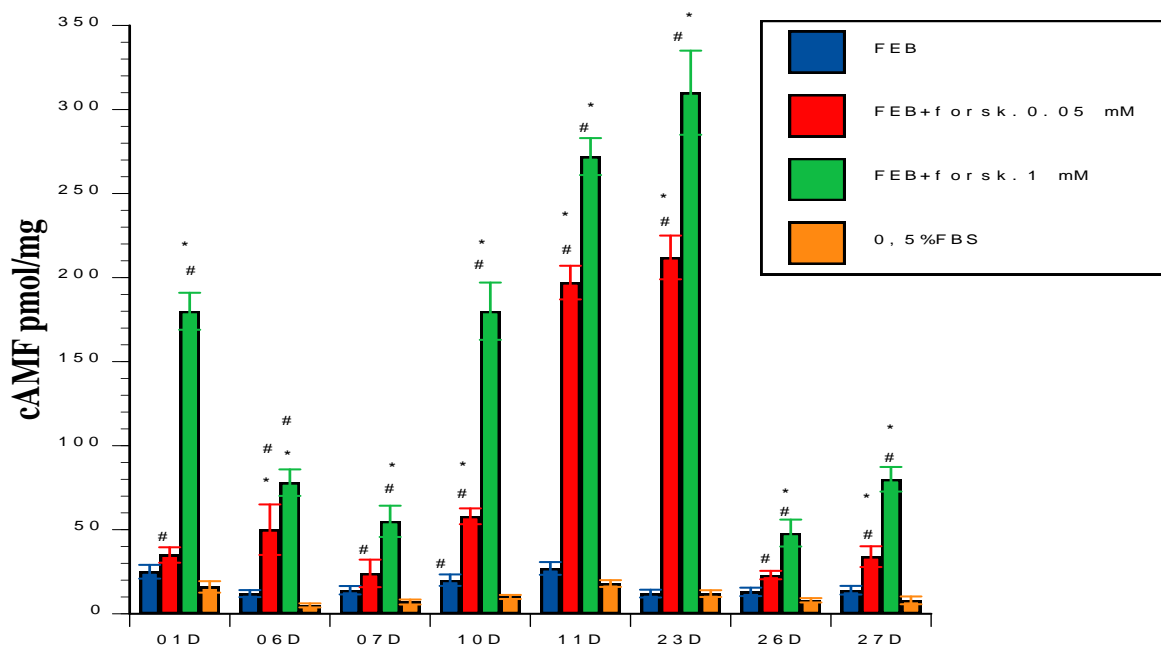
3.3. att. Totālā CREB līmeņi dažādu donoru cilmes šūnu līnijās

Ekspierimenti atkārtoti 3 reizes ar paralēliem mērījumiem.

### 3.4. Forskolīna ietekme uz cAMF producēšanos

Mēs pētījām forskolīna efektu uz cAMF producēšanos koncentrācijās 0,05 mM un 1 mM. Forskolīns ir adenilciklāzes tiešais stimulators un iedarbojas minūšu laikā. To plaši izmanto cAMF producēšanās pētījumos. Donoru 01D, 06D, 07D, 10D, 11D, 23D, 26D un 27D cilmes šūnu kultūras FEB barotnēs stimulējām ar forskolīnu 20 min.

Iegūtie rezultāti rāda (3.4.att.), ka pēc forskolīna pievienošanas FEB barotnei visām šūnu līnijām novēro statistiski ticamu cAMF pieaugumu, salīdzinot ar FEB kontroli. Īpaši spēcīgu efektu uzrāda forskolīna lielākā – 1 mM koncentrācija, bet 11D un 23D arī zemākā forskolīna koncentrācija izraisa ap 40 reizes augstāku cAMF līmeņa pieaugumu nekā FEB barotne.



#### 3.4. att. Forskolīna efektu pētīšana

\*  $P \leq 0.05$  vs. attiecīgo šūnu FEB kontrole

#  $P \leq 0.05$  vs. attiecīgo šūnu kontrolei 0,5% FBS barotnē

Ekspierimenti atkārtoti 3 reizes ar 2 paralēliem mērījumiem.

## DISKUSIJA

Šūnu līnijas daudzos gadījumos var tikt izmantotas kā alternatīva dzīvnieku izmēģinājumiem, lai novērtētu zāļu vielu iedarbību. Jaunākie pētījumi liecina, ka vairāki pašlaik izmantotie medikamenti, piemēram, kolonijas stimulējošie faktori, statīni, angiotenzīna-II receptoru antagonisti/angiotenzīna konvertējošā enzīma (AKE) inhibitori, eritropoetīns, slāpekļa oksīda donori, estrogēni, glitazoni, hemokīnu receptoru antagonisti, glikogēna sintāzes kināzes-3 inhibitori un histonu deacetilāzes inhibitori modulē cilmes šūnu augšanu un diferencēšanos (59). Tomēr nevar vienmēr uzskatīt, ka kultivētas šūnas, pēc dažādu vielu izmēģināšanas uz tām, tieši atbilst šūnām no dzīva organisma. Nemirstīgas šūnas vai ilgtermiņa kultūras var tikt mainītas no ārpuses un uzrādīt izmaiņas genotipā un/vai fenotipā. Tāpēc, lai iegūtu rezultātus, kas ir pietuvināti *in vivo* pētījumiem, no vienas puses pārbaudēm būtu vēlams izmantot primāras donoru šūnas, bet no otras puses atšķirības starp donoriem var apgrūtināt rezultātu vispārināšanu.

Lai izpētītu donoru atšķirības vai līdzības tika izmantotas cilvēka dermas priekšteču šūnas. Pieaugušo dzīves laikā zīdītāju āda pastāvīgi atjaunojas, lai kompensētu lielo daudzumu regulāri zaudēto šūnu. Tādēļ ādas cilmes šūnas ir ar augstu proliferācijas spēju, un šī iezīme ir viegli redzama *in vitro* kultūrā (60). Arī lūkojoties no ētikas normām no ādas izolētas priekšteču šūnas ir pieņemams ieguves avots, kas arī ir minimāli invazīvs, un tādēļ var tikt izmantots tālākiem klīniskiem mērķiem (57, 61).

Cikliskā adenozinmonofosfāta/PKA signālceļu kaskādes pētījumi tiek plaši izmantoti, lai noteiktu daudzu un dažādu vielu efektus uz atšķirīgiem šūnu procesiem, tajā skaitā, metabolismu, augšanu, diferencēšanos un gēnu regulāciju (62, 63, 3).

Eksperimentos kā šūnu proliferāciju veicinošais/inhibējošais aģents tika izmantots db-cAMF, šūnu membrānu šķērsot spējīgs cAMF analogs, kas imitē cAMF līmeņa intracelulārā pieauguma efektus un līdz ar to arī paaugstināta cAMF ietekmi uz šūnu proliferāciju. Šī darba ietvaros tika novērots db-cAMF divējāda efekts uz šūnu proliferāciju un atšķirības starp donoriem. Literatūrā ir atrodami dati par db-cAMF inhibējošo iedarbību *in vivo* uz hormonatkarīgiem audzējiem, kas izpaužas kā pastiprināts audu katabolisms (64), un arī uz ādas mezenhīmas cilmes šūnu proliferāciju (65). Dibutiril-cAMF var inducēt bioķīmiskas un morfoloģiskas izmaiņas gliomas šūnu kultūrās, tādējādi samazinot audzēja apjomus (66).

Dibutiril-cAMF tiek pievienots šūnu barotnēm kopā ar FGF-2, lai stimulētu peles epidermas melanoblastomu proliferāciju un diferencēšanos (67). Dibutiril-cAMF piemīt arī spēja saglabāt intracelulārā cAMF koncentrāciju, kas var uzlabot orgānu dzīvotspēju (68).

Ir atrodami arī ziņojumi, ka intracelulārā cAMF pieaugumam var būt gan proliferatīvi, gan antiproliferatīvi efekti atkarībā no šūnu tipa, mazāk ir zināms par atšķirībām donoru starpā. Piemēram, cAMF stimulē tiroīdo šūnu, neironu un peļu embriju fibroblastu šūnu līnijas (Swiss 3T3) šūnu proliferāciju, bet inhibē limfocītu, fibroblastu un adipocītu proliferāciju (69, 70, 71, 72, 73, 74). Atšķirības starp donoriem tika atklātas cilmes šūnu diferencēšanās laikā (75), jo cAMF ir viens no vispāratzītiem mezenhimālo cilmes šūnu (MSC) diferencēšanās faktoriem (1). Vairāki pētījumi demonstrējuši *cross-talk* (savstarpēja sarunāšanās) starp cAMF signālceļu kaskādi un Ras-Raf-MEK-ERK kaskādi (39, 76). Šūnai noteiktā veidā cAMF var vai nu inhibēt (astrocītus un adipocītus) vai aktivēt (neironus un no kaulu smadzenēm iegūtās MSC) ekstracelulāro signālu regulētās kināzes (ERK) (72, 77, 39, 3).

Maģistra darbā tika pārbaudīti efekti bez seruma barotnei, kas bagātināta ar augšanas faktoriem, kuri darbojas caur mitogēnu aktivētās proteīnkināzes (MAPK) kaskādi uz cAMF producēšanu, un rezultātā novērota barotnes sastāvdaļu stimulējošā iedarbība uz cAMF ražošanu FEB un FEBIT barotnēs, salīdzinot ar barotni bez piedevām. Turpretim LIF pievienošana izraisīja cAMF līmeņa samazināšanos. Par LIF inhibitoro efektu uz MSC proliferāciju ir ziņots arī jau iepriekš (65). Augšanas faktoru un to receptoru divējādo iedarbību var skaidrot ar to pleiotropo dabu un ir izteikta hipotēze, ka augšanas faktori FGF-2, EGF un LIF palīdz saglabāt cilmes šūnu homeostāzi un nediferencēto stāvokli (78, 79).

Tika atrastas arī ievērojamas atšķirības starp donoriem kā atbildes reakcija uz stimulēšanu ar forskolīnu. Tika novērota no koncentrācijas atkarīga forskolīna iedarbība ar augšanas faktoriem papildinātā barotnē, bet netika noteikta sinerģija ar LIF vai FEBIT maisījumu. Forskolīns darbojas aktivējot enzīmu adenilciklāzi un palielinot cAMF intracelulāros līmeņus, tādējādi arī stimulējot neironu diferencēšanos (80, 81), bet inhibējot šūnu proliferāciju (82). Līdzīgu efektu uzrāda GPCR ligandi, ja tie saistās pie ar Gs proteīnu saistīta receptora. Tādēļ var uzskatīt, ka līdzīgas donoru atšķirības varētu novērot arī pēc šūnu stimulēšanas ar dažādiem GPCR ligandiem. Tas ir nozīmīgs apstāklis, ņemot vērā, ka ir gaidāms pieaugums jaunām zālēm, kas mērķētas uz GPCR (51).

## SECINĀJUMI

1. Augšanas faktori FGF un EGF 5 šūnu līnijām stimulēja proliferāciju, bet 3 (23D, 26D un 27D) neizmainīja, bet papildus LIF (leikēmijas inhibitorais faktors) pievienošana FEB barotnei samazināja proliferāciju 01D, 10D un 11D šūnām.
2. Tikai 2 šūnu līnijām db-cAMF no koncentrācijas atkarīgā veidā stimulēja šūnu proliferāciju, divām inhibēja (26D un 27D), bet 2 neietekmēja. 07D un 10D šūnu līnijām db-cAMF 1 mM koncentrācijā samazināja proliferāciju.
3. Forskolīna ietekmē visām šūnu līnijām statistiski ticami paaugstinājās cAMF līmenis, salīdzinot ar kontroli. Īpaši spēcīgu efektu uzrādīja forskolīna lielākā – 1 mM koncentrācija, bet 11D un 23D arī zemākā forskolīna koncentrācija 40 reizes palielināja cAMF producēšanos.
4. Neskatoties uz cilmes šūnu homogenitāti pēc šūnu virsmas marķieriem (65) un mērītā totālā CREB līmeņiem, šo šūnu cAMF bazālie līmeņi un atbildes reakcija uz stimulatoriem atšķiras. Tādēļ jāturpina pētīt, kā manipulācijas ar augšanas faktoriem *in vitro* ietekmē šūnu intracelulāros signālceļus, aktivēto CREB līmeni un citus parametrus, kas atbild par šūnu fizioloģisko atbildes reakciju.

## PATEICĪBAS

Vēlos izteikt pateicību savai darba vadītājai, prof. Rutai Mucenieci, par sniegtajiem ieteikumiem, pacietību un neatsveramo palīdzību mana darba tapšanā!

Liels paldies manai ģimenei un draugiem par izpratni un morālo atbalstu maģistra darba rakstīšanas laikā!

## LITERATŪRA

1. **Boquest A. C., Shahdadfar A., Fronsdal K., Sigurjonsson O., Tunheim S. H., Collas P., Brinchmann J. E.** Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol. Biol. Cell*, 2005, 16, 1131-1141.
2. **Ugland H., Boquest A. C., Naderi S., Collas P., Blomhoff H. K.** AMP-mediated Induction of Cyclin E Sensitizes Growth-arrested Adipose Stem Cells to DNA Damage-induced Apoptosis. Originally published as *MBC* in Press, 10.1091/mbc.E08-01-0094, 2008, vol. 19, N. 12, p. 5082-5092.
3. **Kim S. S., Choi J. M., Kim J. W., Ham D. S., Ghil S. H., Kim M. K., Kim-Kwon Y., Hong S. Y., Ahn S. C., Kim S. U., Lee Y. D., Suh-Kim H.** cAMP induces neuronal differentiation of mesenchymal stem cells via activation of extracellular signal-regulated kinase/MAPK. *Neuroreport*, 2005, 16(12):1357-61.
4. **Lepski G., Jannes C. E., Maciaczyk J., Papazoglou A., Mehlhorn A. T., Kaiser S., Teixeira M. J., Marie S. K., Bischofberger J., Nikkhah G.** Limited Ca<sup>2+</sup> and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Exp. Cell Res.*, 2009, Aug 15. [Epub ahead of print]
5. **Kiessling A. A., Anderson C. S.** *Human Embryonic Stem Cells*. Sudbury: Jones and Bartlett Publ., 2007, ed. 2., 280 p.
6. **Robbins, Cotran** *Pathologic Basis of Disease*. USA: Elsevier Saunders, 2005, ed. 7., p. 91-100.
7. **Penn S. M.** *Stem Cells and Myocardial Regeneration*. New Jersey: Humana Press, 2007. 315 p.
8. **Prockop D. J.** Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science*, 1997, 276:71-74.
9. **Pittenger M. F., Mackay Am., Beck S. C.** et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 1999, 284:143-147.
10. **Murray R. K.** et al. *Harper's Illustrated Biochemistry*. USA: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003, ed. 26., p. 456-473.

11. **Lodish H.** et al. *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Company, 2004, ed. 5., p. 533-570.
12. **Bourne H. R.** How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1997, 9:134–142.
13. **Sprang S. R.** G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Ann. Rev. Biochem.*, 1997, 66:639–678.
14. **Cooper G. M.** *The Cell - A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc., 2000, ed. 2., p. 451-490.
15. **Pierce K. L., Premont R. T., R. J. Lefkowitz** Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, 3:639–652.
16. **Hamm H. E.** How activated receptors couple to G proteins. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 2001, 98:4819-4821.
17. **Morris A. J., Malbon C. C.** Physiological regulation of G protein linked signaling. *Physiol. Rev.*, 1999, 79:1373.
18. **Ferguson S. S., Caron M. G.** G protein–coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin. Cell Develop. Biol.*, 1998, 9:119–127.
19. **Hanoune J., Defer N.** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, 41:145.
20. **Hurley J. H.** Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:7599–7602.
21. **Rall T. W., Sutherland E. W.** Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, 1958, 232:1065–1076.
22. **Sutherland E. W.** Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, 1972, 177:401–408.
23. **Strouch M. B., Jackson E. K., Mi Z., Metes N. A., Carey G. B.** Extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in isolated adipocytes and adipose tissue. *Obes. Res.*, 2005, 13:974–981.
24. **Strewler G. J.** Release of cAMP from a renal epithelial cell line. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1984, 246:C224–C230.
25. **Rosenberg P. A., Dichter M. A.** Extracellular cAMP accumulation and degradation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture. *J. Neurosci.*, 1989, 9:2654–2663.

26. **Vendetti S., Patrizio M., Riccomi A., De Magistris M.T.** Human CD4+ T lymphocytes with increased intracellular cAMP levels exert regulatory functions by releasing extracellular cAMP. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, 80:880–888.
27. **Godinho R. O., Costa V. L. Jr.** Regulation of intracellular cyclic AMP in skeletal muscle cells involves the efflux of cyclic nucleotide to the extracellular compartment. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 138:995–1003.
28. **Hofer A. M., Lefkimiatis K.** Extracellular Calcium and cAMP: Second Messengers as “Third Messengers”? *Physiology*, 2007, 22:320-327.
29. **Cazorla O., Lucas A., Poirier F., Lacampagne A., Lezoualc'h F.** The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2009, 106(33): 14144–14149.
30. **Dou Ai-xia, Wang Xin** Cyclic adenosine monophosphate signal pathway in targeted therapy of lymphoma. *Chinese Medical Journal*, 2010, 123(1):95-99.
31. **Bers D. M.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002, 415(6868):198–205.
32. **Bankir L., Ahloulay M., Devreotes P. N., Parent C.A.** Extracellular cAMP inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved? *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2002, 282:F376–F392.
33. **Jackson E. K., Raghvendra D. K.** The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, 2004, 66:571–599.
34. **Diviani D., Scott J. D.** AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 2001, 114:1431–1437.
35. **Michel J. J., Scott J. D.** AKAP mediated signal transduction. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2002, 42:235–257.
36. **Ahlstrom M., Lamberg-Allardt C.** Regulation of adenosine 3',5-cyclic monophosphate (cAMP) accumulation in UMR-106 osteoblast-like cells: role of cAMP phosphodiesterase and cAMP efflux. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 58:1335–1340.
37. **Kruh G. D., Belinsky M.G.** The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 2003, 22:7537–7552.
38. **Felicielloa A., Gottesmanb M. E., Avvedimentoa E. V.** cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cellular Signalling*, 2005, 17, 279–287.

39. **Stork P. J. S., Schmitt J. M.** Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 2002, vol. 12, N. 6, p. 258-266.
40. **Frank Lee.** *Web books publishing* [tiešsaiste]. Los Angeles, California [atsauce 14.04.2010.]. Pieejams: <http://www.webbooks.com/MoBio/Free/images/Ch6F1.gif>.
41. **Gerits N., Kostenko S., Shiryaev A., Johannessen M., Moens U.** Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. *Cellular Signalling*, 2008, 20, 1592–1607.
42. **Bariagaber A. K., Whalen M. M.** Decreased Adenylyl Cyclase and cAMP-Dependent Protein Kinase Activities Inhibit the Cytotoxic Function of Human Natural Killer Cells. *Human Immunology*, 2003, 64, 866–873.
43. **Zhang W., Morris G. Z., Beebeb S. J.** Characterization of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit C $\gamma$  expressed and purified from sf9 cells. *Protein Expression and Purification*, 2004, 35, 156–169.
44. **Shaywitz A., Greenberg M.** CREB: a stimulus induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Ann. Rev. Biochem.*, 1999, 68:821–861.
45. **Mayr B., Montminy M.** Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001, 2:599–609.
46. **Montminy M.** Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, 66:807.
47. **Vo N., Goodman R.** CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276:13505–13508.
48. **Dworkin S., Malaterre J., Hollande F., Darcy P.K., Ramsay R.G., Mantamadiotis T.** cAMP response element binding protein is required for mouse neural progenitor cell survival and expansion. *Stem Cells*, 2009, 27(6):1347-57.
49. **Hirobe T.** Basic Fibroblast Growth Factor Stimulates the Sustained Proliferation of Mouse Epidermal Melanoblasts in a Serum-Free Medium in the Presence of Dibutyryl Cyclic AMP and Keratinocytes. *Development* 114, 1992, p. 435-445.
50. **Siddappa R., Martens A., Doorn J., Leusink A., Olivo C., Licht R., van Rijn L., Gaspar C., Fodde R., Janssen F., van Blitterswijk C., de Boer J.** cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2008, 105(20):7281-6.

51. **Kroeze W. K., Sheffler D. J., Roth B. L.** G-protein-coupled receptors at a glance. *Journal of Cell Science*, 2003, 116, 4867-4869.
52. **Shimizu E., Nakayama Y., Nakajima Y., Kato N., Takai H., Kim D.S., Arai M., Saito R., Sodek J., Ogata Y.** Fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP synergistically regulate bone sialoprotein gene expression. *Bone*, 2006, 39(1):42-52.
53. **Wang X., Li X., Wang K., Zhou H., Xue B., Li L., Wang X.** Forskolin cooperating with growth factor on generation of dopaminergic neurons from human fetal mesencephalic neural progenitor cells. *Neurosci. Lett.*, 2004, 362(2):117-21.
54. **Kingham P. J., Kalbermatten D. F., Mahay D., Armstrong S. J., Wiberg M., Terenghi G.** Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp. Neurol.*, 2007, 207(2):267-74.
55. **Black E. G., Logan A., Davis J. R. E., Sheppard M. C.** Basic fibroblast growth factor affects DNA synthesis and cell function and activates multiple signalling pathways in rat thyroid FRTL-5 and pituitary GH<sub>3</sub> cells. *Journal of Endocrinology*, 1990, 127, 39-46.
56. **Belicchi M., Pisati F., Lopa R., Porretti L., Fortunato F., Sironi M., Scalapogna M., Parati E. A., Bresolin N., Torrente Y.** Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.*, 2004, 77(4):475-86.
57. **Toma J. G., McKenzie I. A., Bagli D., Miller F. D.** Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells*, 2005, 23(6):727-737.
58. **Wong C. E., Paratore C., Dours-Zimmermann M. T., Rochat A., Pietri T., Suter U., Zimmermann D. R., Dufour S., Thiery J. P., Meijer D., Beermann F., Barrandon Y., Sommer L.** Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J. Cell Biol.*, 2006, 175(6):1005-15.
59. **Romagnani P., Lasagni L., Mazzinghi B., Lazzeri E., Romagnani S.** Pharmacological modulation of stem cell function. *Curr. Med. Chem.*, 2007, 14(10):1129-39.
60. **Alonso L., Fuchs E.** Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, doi:10.1073/pnas.1734203100).
61. **da Silva Meirelles L., Chagastelles P. C., Nardi N. B.** Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, 2006, 119:2204 –2213.

62. **Vossler M. R., Yao H., York R. D., Pan M. G., Rim C. S., Stork P. J.** cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, 1997, 89(1):73-82.
63. **Daniel P. B., Walker W. H., Habener J. F.** Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu. Rev. Nutr.*, 1998, 18:353-83.
64. **Cho-Chung Y. S., Gullino P. M.** *In Vivo* Inhibition of Growth of Two Hormone-Dependent Mammary Tumors by Dibutyryl Cyclic AMP. *Science*, 1974, 183(120):87-8.
65. **Riekstina U., Muceniece R., Cakstina I., Muiznieks I., Ancans J.** Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 2008, 58(3):153-162.
66. **Zhu F. Q., Du Z. W., Bao Y. D.** Db-cAMP in the Treatment of Recurrent Malignant Glioma - Report of 7 Patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 1987, 9(6):460-2, 21.
67. **Joshi C. V., Enver T.** Plasticity Revisited. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, 14:749-755.
68. **Tomita I., Sawa M., Munakata T., Tanaka K., Kasai S.** The Beneficial Effect of Dibutyryl Cyclic Adenosine Monophosphate on Warm Ischemic Injury of the Rat Liver Induced by Cardiac Arrest. *Transplantation*, 1996, 62(2):167-73.
69. **Rozengurt E., Legg A., Strang G., Courtenay-Luck N.** Cyclic AMP: a mitogenic signal for Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1981, 78(7):4392-6.
70. **Blomhoff H. K., Smeland E. B., Beiske K., Blomhoff R., Ruud E., Bjørø T., Pfeifer-Ohlsson S., Watt R., Funderud S., Godal T. et al.** Cyclic AMP-mediated suppression of normal and neoplastic B cell proliferation is associated with regulation of myc and Ha-ras protooncogenes. *J. Cell Physiol.*, 1987, 131(3):426-33.
71. **Burgering B. M., Pronk G. J., van Weeren P. C., Chardin P., Bos J. L.** cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. *EMBO J.*, 1993, 12(11):4211-20.
72. **Sevetson B. R., Kong X., Lawrence J. C. Jr.** Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1993, 90(21):10305-9.
73. **Dugan L. L., Kim J. S., Zhang Y., Bart R. D., Sun Y., Holtzman D. M., Gutmann D. H.** Differential effects of cAMP in neurons and astrocytes. Role of B-raf. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274(36):25842-8.

74. **Iacovelli L., Capobianco L., Salvatore L., Sallese M., D'Ancona G. M., De Blasi A.** Thyrotropin activates mitogen-activated protein kinase pathway in FRTL-5 by a cAMP-dependent protein kinase A-independent mechanism. *Mol. Pharmacol.*, 2001, 60(5):924-33.
75. **Siddappa R., Licht R., van Blitterswijk C., de Boer J.** Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J. Orthop. Res.*, 2007, 25(8):1029-41.
76. **Dumaz N., Marais R.** Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J.*, 2005, 272(14):3491-504.
77. **Jaiswal R. K., Moodie S. A., Wolfman A., Landreth G. E.** The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol. Cell Biol.*, 1994, 14(10):6944-53.
78. **Metcalf D.** The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells*, 2003, 21(1):5-14.
79. **De Felici M., Farini D., Dolci S.** In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2009, 4(2):87-97.
80. **Son H., Kim K.O., Kim J.S., Chang M.Y., Lee S.H., Lee Y.S.** Pairing of forskolin and KCl increases differentiation of immortalized hippocampal neurons in a CREB Serine 133 phosphorylation-dependent and extracellular-regulated protein kinase-independent manner. *Neurosci. Lett.*, 2001, 308: 37-40.
81. **Palmer T.D., Takahashi J., Gage F.H.** The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol. Cell Neurosci.*, 1997, 8: 389-404.
82. **Chen T.C., Hinton D.R., Zidovetzki R., Hofman F.M.** Up-regulation of the cAMP/PKA pathway inhibits proliferation, induces differentiation, and leads to apoptosis in malignant gliomas. *Lab. Invest.*, 1998, 78: 165-74.

Maģistra darbs „Cikliskā adenozinmonofosfāta līmeņu atšķirības starp cilmes šūnu donoriem” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autore: Anete Laizāne

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: profesore Dr. hab. biol. Ruta Muceniece

Recenzente: docente Una Riekstiņa

Darbs iesniegts Farmācijas studiju programmā 24.05.2010.

Metodiķe: Juta Bārtule

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē