

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MOLEKULAARBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Tuuliki Biene

**Pseudokinaasi Trib3 roll rakkude vastuses
dokosaheksaeenhappe või arseniidi poolt põhjustatud stressile**

Magistritöö

Juhendajad
Tiit Örd
Dr. Tõnis Örd

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1. Pseudokinaas TRIB3	8
1.1.1. Tribbles valguperekonna liikmed puuviljakärbses ja imetajates ...	8
1.1.2. Trib3 avastamine	8
1.1.3. <i>TRIB3</i> geen	8
1.1.4. <i>TRIB3</i> mRNA	9
1.1.5. TRIB3 valk	10
1.1.6. <i>TRIB3</i> ekspressioon	10
1.2. TRIB3 interaktsioonid teiste valkudega	11
1.2.1. Akt/PKB	11
1.2.2. MAPK	11
1.2.3. NF- κ B	11
1.2.4. ATF4 ja CHOP	12
1.2.5. ATF4-CHOP-TRIB3 vaheline regulatoorne mehhanism	12
1.3. Apoptoos ehk programmeeritud rakusurm	14
1.4. Imetajaraku stressivastus ja TRIB3 stressivastuse reguleerijana	15
1.4.1. Integreeritud stressivastus (ISR) ja voltimata valkude vastus (UPR)	15
1.4.2. ER stressi poolt põhjustatava rakusurma mehhanism	16
1.4.3. TRIB3 kui imetajaraku stressivastuse moduleerija	17
1.4.4. AMPK endoplasmaatilise retiikulumi stressivastuses	17
1.5. Arseniit	18
1.5.1. Arseniidi poolt põhjustatava rakusurma molekulaarne mehhanism	18
1.5.2. Arseniidi poolt indutseeritavad stressid	18
1.5.2.1. Oksüdatiivne stress	18
1.5.2.2. Genotoksiline stress	19

1.5.2.3.	Endoplasmaatilise retiikulumi stress.....	19
1.6.	Polüküllastumata rasvhapped	20
1.6.1.	Oomega-3 rasvhapete hulka kuuluv dokosaheksaeenhape.....	20
1.6.2.	Dokosaheksaeenhape vähkkasvajates.....	20
1.6.3.	Dokosaheksaeenhappe poolt põhjustatava rakusurma molekulaarne mehhanism.....	21
1.6.4.	Dokosaheksaeenhappe poolt põhjustatud rakustressid kasvajakudedes	21
1.6.4.1.	Oksüdatiivne ja genotoksiline stress	21
1.6.4.2.	Endoplasmaatilise retiikulumi stress.....	22
2.	EKSPERIMENTAALNE OSA	23
2.1.	Töö eesmärgid	23
2.2.	Materjalid ja meetodika.....	24
2.2.1.	Imetajarakkude kultuurid ja kasvatamine.....	24
2.2.2.	Stressivastuse indutseerimine rakkudes.....	24
2.2.3.	HCT-15 rakkude transfekdeerimine	25
2.2.4.	Kondenseerunud kromatiiniga tuumade loendamine	25
2.2.5.	Rakkude elulemuse mõõtmine alamarBlue reagentiga	25
2.2.6.	Totaalse RNA eraldamine rakukultuurist	26
2.2.7.	Totaalse RNA töötlemine DNaaS I-ga.....	26
2.2.8.	cDNA esimese ahela süntees	26
2.2.9.	Reaalaja PCR.....	27
2.2.10.	Hiire embrüonaalsete fibroblastide tegemine.....	28
2.2.11.	Valkude elektroforees.....	29
2.2.12.	<i>Western blot</i>	29
2.2.13.	Rakutsükli analüüs läbivoolu tsütomeetril	30
2.2.14.	Redutseeritud glutatiooni taseme mõõtmine	30
2.2.15.	Valgusünteesi kiirus	30
2.2.16.	Tulemuste statistiline analüüs.....	31

2.3.	Tulemused ja arutelu	32
2.3.1.	TRIB3 mõju rakkude elulemusele dokosaheksaeenhappes või arseniidist põhjustatud rakustressi tingimustes	32
2.3.1.1.	TRIB3 ei mõjuta HCT-15 käärsöolevähi rakkude elulemust dokosaheksaeenhappes tingitud stressi korral	32
2.3.1.2.	TRIB3 suurendab MEF-de elulemust arseniidistressi tingimustes	34
2.3.2.	Arseniidistress põhjustab MEF-de kogunemise rakutsükli G0/G1 faasi nii <i>Trib3</i> olemasolu kui ka puudumise korral.....	36
2.3.3.	Valgusüntees inhibeeritakse arseniidistressi tingimustes <i>Trib3</i> ^{+/+} ja <i>Trib3</i> ^{-/-} rakkudes sarnaselt	37
2.3.4.	Fosforüleeritud AMPK tase <i>Trib3</i> ^{+/+} ja <i>Trib3</i> ^{-/-} rakkudes on arseniidistressi tingimustes sarnaselt reguleeritud	39
2.3.5.	Arseniit aktiveerib ER stressiga seotud ATF4-CHOP rada <i>Trib3</i> ^{-/-} rakkudes tugevamalt kui <i>Trib3</i> ^{+/+} rakkudes	40
2.3.6.	GSH tase arseniidistressi tingimustes on kõrgem metsiktüüpi hiire embrüonaalsetes fibroblastides võrrelduna <i>Trib3</i> ^{-/-} MEF-dega	42
	KOKKUVÕTE	45
	SUMMARY	46
	TÄNUSÕNAD	47
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	48
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	55
	Lihtlitsents lõputöö elektrooniliseks avaldamiseks	56

LÜHENDID

β-ME	β-merkaptopetanol
Akt/PKB	<i>Akt kinase/protein kinase B</i> (Akt kinaas/proteiniinkinaas B)
AMPK	AMP-aktiveeritav proteiinkinaas
ATF	<i>activating transcription factor</i> (aktiveeriv transkriptsioonifaktor)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> (B-rakuline lümfoom 2)
Bim	<i>bcl-2 interacting mediator of cell death</i> (bcl-2 interakteeruv rakusurma mediaator)
BSO	butioniinsulfoksimiin
bZIP	<i>basic region leucine zipper</i> (aluseline regioon ja leutsiini tõmbelukk)
CDC25	<i>cell division cycle 25</i> (rakutsükli reguleeriv valk 25)
C/EBP-ATF	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i> (CCAAT/enhaanserit siduv valk)
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i> (C/EBP-ga homologne valk)
CRE	<i>cAMP response element</i> (cAMP vastuselement)
CREB	<i>CRE-binding protein</i> (CRE-seonduv valk)
DD	<i>death domain</i> (surmadomeen)
DHA	<i>docosahexaenoic acid</i> (dokosaheksaeenhape)
DMSO	dimetüülsulfoksiid
DR	<i>death receptor</i> (surmaretseptor)
eIF	eukarüootne translatsiooni initsiatsioonifaktor
EPA	<i>eicosapentaenoic acid</i> (eikasopentaeenhape)
ER	endoplasmaatiline retiikulum
FCS	<i>fetal calf serum</i> (veise loote seerum)
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 34</i> (kasvu pidurduse ja DNA kahjustuse korral indutseeritav valk 34)
GCN2	<i>general control non-derepressible 2</i> (aminohapete biosünteesi üldise regulatsiooni mitte-indutseeritav mutant 2)
HRI	<i>heme-regulated inhibitor</i> (heemi poolt reguleeritud inhibiitor)
IRE1	<i>inositol-requiring enzyme 1</i> (inositooli vajav ensüüm 1)
ISR	<i>integrated stress response</i> (integreeritud stressivastus)
MCB	monoklorobimaan
MDA	maloondialdehüüd
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> (hiire embrüonaalsed fibroblastid)
NAC	<i>N-acetyl cysteine</i> (N-atsetüülsüsteiin)
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> (asendatavad aminohapped)

NF- κ B	<i>nuclear transcription factor-κB</i> (tuuma transkriptsioonifaktor κ B)
NIPK	<i>neuronal cell death inducible putative kinase</i> (närvirakkude surma tingimustes indutseeritav oletatav kinaas)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (füsioloogiline lahus fosfaatpuhvrts)
PERK	<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i> (PKR-sarnane ER-is paiknev kinaas)
PKR	<i>protein kinase R</i> (proteiinkinaas R)
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acid</i> (polüküllastumata rasvhape)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (kvantitatiivne ehk reaallaja PCR)
RNAi	RNA interferents
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (hapniku vabad radikaalid)
RT-qPCR	reverse-transcription qPCR (pöördtranskriptsioonil saadud matriitsilt qPCR)
SINK	<i>p65-interacting inhibitor of NF-κB</i> (p65-seonduv NF- κ B inhibiitor)
SKIP	<i>stress kinase inhibitory protein</i> (stressi kinaasi inhibeeriv valk)
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> (kasvaja nekroosifaktor)
TRIB	<i>tribbles homolog</i> (Tribbles-i homoloog)
UPR	<i>unfolded protein response</i> (võlmitata valkude vastus)
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i> (X-boksi siduv valk 1)

SISSEJUHATUS

Organismid peavad toime tulema erinevate ebasoodsate olukordadega. Kui tingimused põhjustavad rakkude kõrvalekalde homöostaatilisest olekust ehk teisisõnu põhjustavad rakustressi, siis käivitavad rakud signaaliülekanne ahelad, mis aitavad rakkudel muutustega kohaneda. Kui kohanemine pole võimalik, siis käivitatakse rakusurma programm.

Üheks stressivastuse rajaks, mis rakkudes eritiübiliste stressorite korral aktiveeritakse, on eukarüootse translatsiooni initsiatsioonifaktori 2α (eIF2 α) fosforüleerimise rada. eIF2 α fosforüleerimine toob kaasa translatsiooni initsiatsiooni pidurdumise enamusel mRNA-del, kuid suurendab aktiveeriva transkriptsioonifaktori 4 (ATF4) sünteesi. ATF4 üheks märklaudgeeniks on Tribbles homolog 3 (TRIB3). TRIB3 ekspressioon aktiveeritakse vastusena erinevatele rakustressidele, nagu kaltsiumi ainevahetuse rikkumine, valkude puudulik moditseerimine endoplasmaatilises retiikulumis, toitainete puudumine jne. *Trib3* ülesregulatsiooni on täheldatud ka polüküllastamata rasvhapete või arseniidi poolt põhjustatud stressi korral. Erinevate interaktsioonide kaudu on TRIB3 seotud raku stressivastuse koordineerimisega ning on seetõttu võimeline mõjutama rakkude elulemust.

Käesoleva töö teoreetiline pool annab lühiülevaate TRIB3 valgu omadustest ja interaktsioonidest ning TRIB3 kodeeriva geeni struktuurist ja regulatsioonist. Samuti käsitletakse imetajarakkude stressivastuse mehhanisme, mis käivituvad polüküllastamata rasvhappe dokosaheksaeenhappe või arseniidi toimele. Eksperimentaalses osas uuritakse, kuidas mõjutab TRIB3 rakkude stressivastust dokosaheksaeenhappele või arseniidile ja milline on TRIB3 toime rakkude elulemusele nende ainete poolt tekitatud stressi korral.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi molekulaarbioloogia õppetoolis ning Eesti Biokeskuses.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Pseudokinaas TRIB3

1.1.1. Tribbles valguperekonna liikmed puuviljakärbses ja imetajates

Tribbles valg avastati puuviljakärbses *Drosophila melanogaster* samaaegselt mitme tööruhma poolt (Grosshans & Wieschaus, 2000; Mata jt., 2000; Seher & Leptin, 2000). Leiti, et puuviljakärbses Tribbles valg on String ja Twine proteiinide (imetajate CDC25 homologid) negatiivseks regulaatoriks, blokeerides rakutsükli üleminekut G2 faasist M faasi. Puuviljakärbses Tribbles valgu ortoloogideks imetajates on Tribbles valgud Trib1, Trib2 ja Trib3, millel on rakus valdavalt erinevad funktsioonid (Lohan & Keeshan, 2013).

1.1.2. *Trib3* avastamine

TRIB3 isoleeriti esmalt Mayumi-Matsuda jt. (1999) tööruhma poolt roti rakuliinist PC6-3, mis pärineb rakuliinist PC12. PC6-3 rakud, nagu ka eellasliini PC12 rakud, diferentseeruvad närvikasvufaktori toimele sümpaatilisi neuroneid meenutavateks rakkudeks. Neuraalselt diferentseerunud PC6-3 rakud on väga tundlikud närvikasvufaktori eemaldamise suhtes, käivitades selles olukorras kiiresti programmeeritud rakusurma. *Trib3* leiti kui geen, mis on tugevasti indutseeritud PC6-3 rakkudes närvikasvufaktori eemaldamise korral. Lisaks leiti, et *Trib3* ekspressioon aktiveeriti kortikaalsetes neuronites Ca^{2+} ionofoori A23187 mõjul (Mayumi-Matsuda jt., 1999).

TRIB3 on avastatud erinevate tööruhmade poolt ning varajastes artiklites on TRIB3 sünonüümidega kasutatud: NIPK [*neuronal cell death inducible putative kinase* (Mayumi-Matsuda jt., 1999; Ord & Ord, 2003)], SKIP3 [*stress kinase inhibitory protein 3* (Bowers jt., 2003)], SINK [*p65-interacting inhibitor of NF- κ B* (Wu jt., 2003)] ja TRB3 [*tribbles homolog 3* (Ohoka jt., 2005; Ord & Ord, 2005)].

1.1.3. *TRIB3* geen

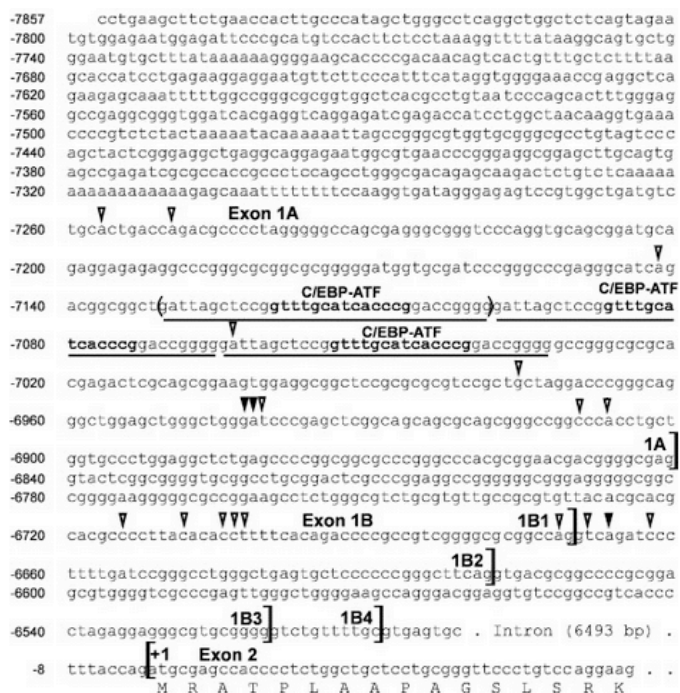
Hiire *Trib3* (*mTrib3*) geen paikneb 2. kromosoomil (www.Ensembl.org). Inimese *TRIB3* (*hTRIB3*) geen asub 20. kromosoomil positsioonil 13-p12.2 ja koosneb neljast eksonist, mille vahel paikneb kolm intronit. *hTRIB3* geeni pikkuseks on ligikaudu 8 kb ja mRNA valku kodeeriv ala on 1077 nukleotiidi pikk (Bowers jt., 2003).

mTRIB3 promooteri regioonis asub 33 aluspaarist koosnev tandeemne kordusjärjestus, mis sisaldab C/EBP-ATF (*CCAAT/enhancer binding protein-activating transcription factor*) seondumissaiti (Selim jt., 2007). *hTRIB3* promooteris leidub 3 sellist segmenti (joonis 1) (Ord

& Ord, 2005). C/EBP-ATF liitjärjestus *TRIB3* promooteril võimaldab seonduda ATF perekonna heterodimeeridel, C/EBP perekonna heterodimeeridel ning C/EBP-ATF heterodimeeridel (Ohoka jt., 2005; Ord & Ord, 2005). Seeläbi on võimalik *TRIB3* promooterit aktiveerida stresside korral, mis indutseerivad eIF2 α -ATF4 raja aktiveerimist (Jousse jt., 2007; Ord & Ord, 2005).

1.1.4. *TRIB3* mRNA

Ord jt. (2005) on näidanud et *hTRIB3* mRNA-l on 5 erinevat isovormi, mis kõik sisaldavad sama kodeerivat regiooni, kuid erinevad 5' regioonide poolest, mis jäävad ülesvoolu *TRIB3* translatsiooni start koodonist. Joonisel 1 on näha, et *TRIB3* genoomse DNA alternatiivse splaissimise teel võib tekkida 5 erinevat isovormi. 1A isovorm on splaissvariantidest kõige pikem sisaldades 1A eksonit, mida ülejäänud isovormid ei sisalda. 1B ekson sisaldab nelja erinevat splaissimissaiti, mille tulemusena võib tekkida neli erinevat mRNA isovormi. 1B eksoni isovormidest ligikaudu 90% moodustab 1B4 isovorm. Stressitingimustes indutseeritakse 1B variandid, mis normaalses tingimustes on väga nõrgalt ekspresseeritud, suuremal määral kui 1A variant (Ord & Ord, 2005).



Joonis 1. Inimese *TRIB3* promooterala. Joonisel on toodud *hTRIB3* geeni 5'terminaalne regioon. Paremale poole avatud nurksuluga on märgitud splaissimise aktseptorjärjestus ning vasakule poole avatud nurksulgudega splaissimise doonorjärjestused. Kolmnurgad tähistavad transkriptsiooni initsatsiooni saite, kusjuures täidetud kolmnurgad tähistavad enamkasutatavaid saite. Alla on joonitud 33 nukleotiidsed kordusjärjestused (esimene on ümarsulgudes). C/EBP-ATF seondumisjärjestus on rasvases trükis (Ord ja Ord, 2005).

1.1.5. TRIB3 valk

mTRIB3 valk koosneb 354 aminohappejäägist (Ord & Ord, 2003). hTRIB3 valk koosneb 358 aminohappejäägist, mille molekulmass on hinnaguliselt 39,8 kDa (Bowers jt., 2003). Hegedus jt. (2007) on näidanud, et TRIB3 valk koosneb seriini/treoniini kinaasi-laadsest domäänist, mida ümbritsevad lühikesed NH₂- ja COOH-terminaalsed segmendid. NH₂-terminaalne segment on ligikaudu 60-80 aminohappe pikkune ning sellele on iseloomulik suhteliselt kõrge seriini ja proliini sisaldus (Hegedus jt., 2007). COOH-terminaalne regioon on ligikaudu 35-45 aminohappe pikkune ja on suhteliselt rikas laenguga aminohapete poolest (Hegedus jt., 2007). TRIB3 kinaasilaadne segment koosneb 12 subdomeenist ning ei sisalda mitmeid domeene, mis esinevad katalüütiliselt aktiivsetel kinaasidel (näiteks ATP seondumiseks vajalikud aminohappejäägid) (Hegedus jt., 2007). Kuna Bowers jt. (2003) on näidanud, et TRIB3 ei oma substraadi fosforüleerimise või autofosforüleerimise võimet liigitatakse TRIB3 pseudokinaaside hulka. Inimese ja hiire TRIB3 kinaasidomeenid on 82% osas identsed (Ord, 2008).

1.1.6. TRIB3 ekspressioon

TRIB3 on erineval määral ekspresseeruv mitmetes kudedes ning geeni avaldumist on uuritud erinevates rakuliinides ja imetajate kudedes.

Ord jt. (2003) leidsid täiskasvanud hiire *Trib3* ekspressioonimustri uurimise käigus, et see geen avaldub peamiselt maksas. Vähemal määral on *Trib3* geeni avaldumine detekteeritud ka südames, neerus, peensooles, nahas, maos ja kopsus ning ekspressioon ei olnud tuvastatav skeletilihastes, põrnas, ajus testistes ja tüümuses (Okamoto jt., 2007; Ord & Ord, 2003). Bowers jt. (2003) leidsid, et h*TRIB3* ekspressioon on samuti kõige kõrgem maksas ning nõrgalt on ekspressioon detekteeritav ka teistes kudedes. Lisaks uuriti antud töös *TRIB3* ekspressiooni taset normaalsetes kudedes ja võrreldi tasemeid samadest kudedest pärit kasvajate rakuliinidega. Näidati, et *TRIB3* mRNA on üleekspresseeritud rinna-, kopsu-, emaka-, munasarja- ja käärsoolekasvajates. *TRIB3* ekspressioon indutseeritakse ka eritüübiliste stressitingimuste korral. *TRIB3* ekspressiooni aktivatsiooni on näidatud Ca²⁺ tasakaalu häirimisel, mis põhjustab endoplasmaatilise retiikulumi stressi (Mayumi-Matsuda jt., 1999; Ord & Ord, 2003). Lisaks on kirjandusest teada, et *TRIB3* ekspressioon indutseeritakse arseniidistressi korral (Ord & Ord, 2005) ja asendamatu aminohappe puudumisel (Jousse jt., 2007; Ord jt., 2007). *TRIB3* ekspressiooni induktsiooni on näidatud ka dokosaheksaenehapestressi tingimustes (Jakobsen jt., 2008).

1.2. TRIB3 interaktsioonid teiste valkudega

1.2.1. Akt/PKB

Proteiinkinaas B (Akt/PKB) on seriin/treoniin kinaas, mis aktiveeritakse insuliini poolt ning mille üheks funktsiooniks on inhibeerida glükoosi väljutamist maksast. TRIB3 on insuliini pool stimuleeritud Akt/PKB negatiivseks regulaatoriks, inhibeerides Akt fosforüleerimist (Du jt., 2003). Du jt. (2003) näitasid, et TRIB3 seondub Akt/PKB valguga aminohapete 239-265 vahendusel. TRIB3 seandumine inhibeerib Akt/PKB fosforüleerimist treoniinijäägi 308 ja seriinijäägi 437 positsioonis, kusjuures Akt/PKB valgu tase rakkudes ei muutunud. TRIB3 inhibeerivat mõju Akt/PKB fosforüleerimisele on näidatud ka etanooli töötamise korral (He jt., 2006). Leiti, et lisaks treoniini fosforüleerimise takistamisele positsioonis 308, inhibeerib TRIB3 Akt/PKB poolt vahendatud signalisatsiooni, takistades Akt/PKB seandumist membraaniga.

1.2.2. MAPK

Mitogeen-aktiveeritud proteiinkinaas (MAPK) kaskaad koosneb seriin/treoniin kinaasidest, mis vastavalt struktuurile jagunevad kolme mitmeliikmelisse alaperekonda: ekstratsellulaarse signaali poolt reguleeritud proteiinkinaasid (ERKid), c-Jun aminoterminalsed kinaasid (JNK-id) ja p38 valgud (Garrington & Johnson, 1999). HeLa rakkudes madalatel TRIB3 üleekspressiooni doosidel aktiveeritakse JNK ja ERK raja aktivatsioon, samal ajal p38 rada inhibeeritakse (Kiss-Toth jt., 2004). ERK aktiveerimist TRIB3 vahendusel toetavad MDA-MB231 rakuliini andmed, kus TRIB3 vaigistamine RNAi (RNA interferents) meetodil toob kaasa ERK1/2 valgu taseme vähenemise (Izrailit jt., 2013). Lisaks on näidatud, et tsütokiinide poolt aktiveeritav JNK fosforüleerimine on inhibeeritud *Trib3*^{-/-} hiirtest eraldatud pankrease saarekestes, võrreldes TRIB3 metsiktüüpi pankrease saarekestega (Humphrey jt., 2014).

1.2.3. NF-κB

Tuuma transkriptsioonifaktor κB (NF-κB) perekonna transkriptsioonifaktorid on olulised immuunvastusega seotud protsesside reguleerimises, kuid lisaks on NF-κB seotud ka rakulise vastusega erinevatele stressidele (Pahl, 1999). HEK293 rakkudes on näidatud, et kasvaja nekroosifaktor (TNF) poolt indutseeritud NF-κB transkriptsioonilist aktiivsust inhibeeritakse *TRIB3* üleekspressiooni korral doosoltuvalt. Leiti, et TRIB3 ei inhibeeriks NF-κB translokatsiooni tuuma ega seandumist DNA-ga. Samuti ei takista TRIB3 NF-κB subühikute p65 ja p50 interaktsiooni. Selgus, et TRIB3 interakteerub p65 valguga ja takistab viimase

fosforüleerimist PKAc poolt. Kuna TRIB3 on omakorda aktiveeritav NF- κ B poolt, siis on tegemist negatiivsel tagasisidel põhineva regulatsiooni mehhanismiga (Du jt., 2003). TRIB3 inhibeerivat mõju NF- κ B rajale on näidatud ka söögitoru epiteeli rakuliinis HET1A (Duggan jt., 2010). Vastupidiselt eelmistele tööühmadele on roti pankrease β -rakkudes leitud, et TRIB3 aktiveerib NF- κ B rada. Nimelt näidati, et INS-1 rakkudes põhjustab doksütsükliini poolt aktiveeritud TRIB3 p65 valguga fosforüleerumise suurenemise (Fang jt., 2014). Võib oletada, et erinevused TRIB3 sõltuvas NF- κ B transkriptsioonilise aktiivsuse inhibeerimises tulenevad kasutatud erinevatest rakuliinidest.

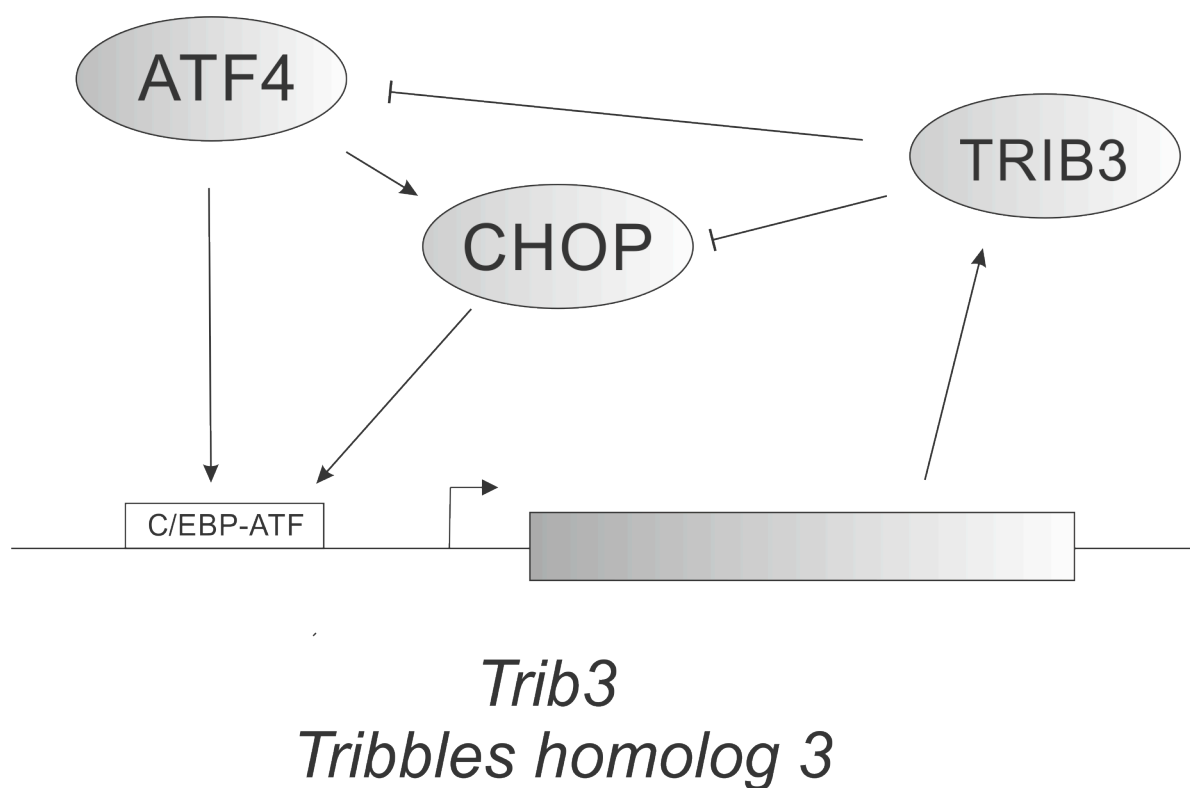
1.2.4. ATF4 ja CHOP

Aktiveeriv transkriptsioonifaktor 4 (ATF4) kuulub ATF/CREB (aktiveeriv transkriptsioonifaktor/cAMP vastuselementi siduv valk) transkriptsioonifaktorite perekonda, mis kuuluvad bZIP transkriptsioonifaktorite hulka. C/EBP homoloogne proteiin (CHOP) kuulub CCAAT/enhaanser seonduvate proteiinide (C/EBP) perekonda, mis kuuluvad samuti bZIP transkriptsioonifaktorite hulka. bZIP transkriptsioonifaktoritele on iseloomulik aluselise regiooni (vahendab interaktsioone DNA-ga) ja leutsiini tõmblukk struktuuri (vahendab dimeriseerumist teise leutsiin-tõmblukku omava valguga) esinemine (Hai & Curran, 1991). CHOP ja ATF4 on võimelised omavahel dimeriseeruma bZIP regiooni kaudu (Hai & Hartman, 2001). Sõltuvalt transkriptsioonifaktorist, millega ATF4 seondub, võib ATF4 funktsioneerida transkriptsioonilise aktivaatorina (Liang & Hai, 1997) või repressorina (Karpinski jt., 1992). ATF4 poolt aktiveeritavate märklaudgeenide hulka kuuluvad nii rakustressiga kohanemise eest vastutavad geenid (näiteks aminohapete sünteesi ja transpordiga seotud geenid ning antioksidantse vastuse geenid) kui ka stressist põhjustatud rakusurma indutseerivad geenid (Han jt., 2013; Harding jt., 2003).

1.2.5. ATF4-CHOP-TRIB3 vaheline regulatoorne mehhanism

ATF4 indutseerib nii CHOP kui ka TRIB3 ekspressiooni, kusjuures CHOP ekspressiooni aktivatsioon indutseerib täiendavalt TRIB3 ekspressiooni. TRIB3 omakorda inhibeerib ATF4 ja CHOP ning seeläbi toimib negatiivsel tagasisidel põhinev regulatoorne võrgustik (joonis 2). ATF4 ja CHOP seonduvad TRIB3 promooteris tuvastatud 33-aluspaari pikkusele C/EBP-ATF kordusjärjestustele ning aktiveerivad seeläbi TRIB3 ekspressiooni rakustressi tingimustes (Ohoka jt., 2005; Ord & Ord, 2005). Seejuures CHOP üksinda ei suuda promooterit aktiveerida (Ohoka jt., 2005). TRIB3 on võimeline seonduma ATF4 ja CHOP valkudega ning seeläbi inhibeerib transkriptsioonifaktorite funktsioneerimist (Ohoka jt., 2005;

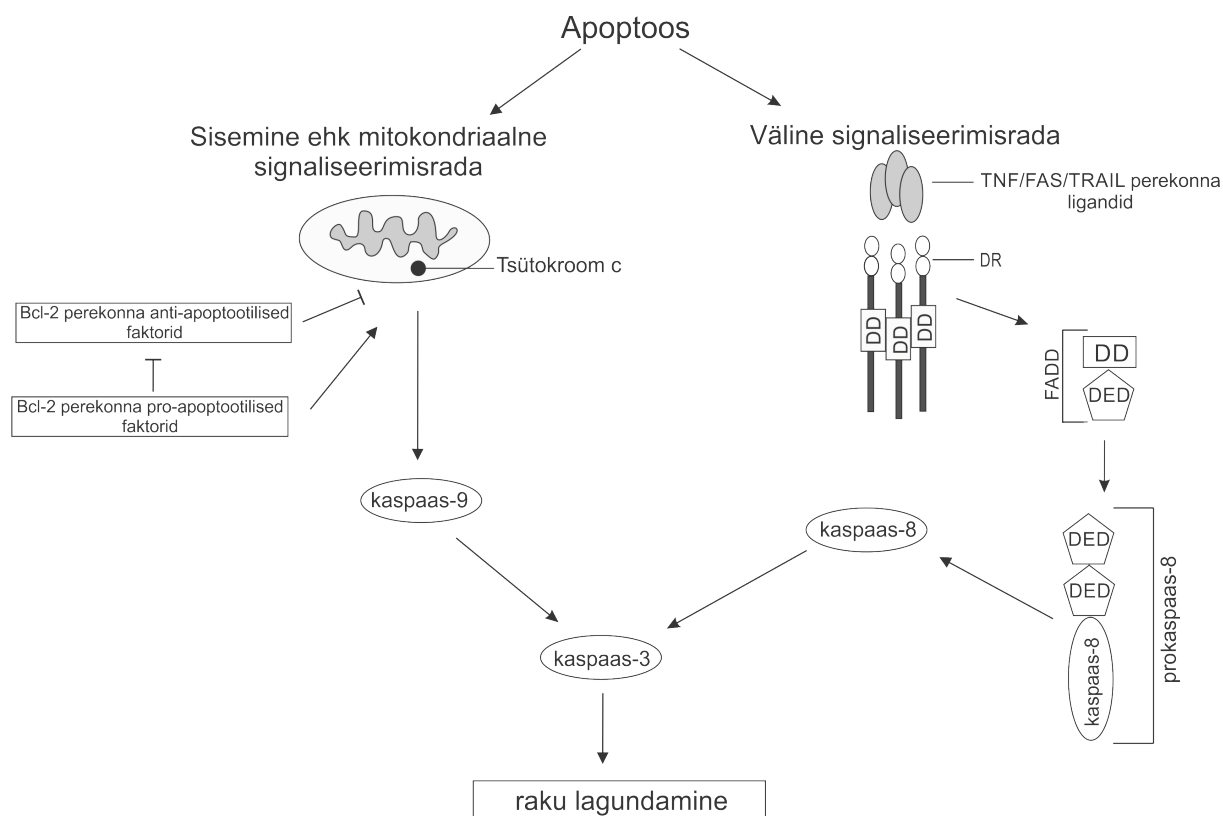
Ord & Ord, 2003). Üllatuslikult ei tuvastatud, et TRIB3 suunaks ATF4 ja CHOP valke lagundamisele. Inhibeerimine ei toimi ka läbi DNA-seondumise takistamise. Aminohapete puudusest tingitud stressi korral on näidatud, et ATF4-mTRIB3 kompleks on võimeline seonduma CRE (*cAMPK response element*, mis on üheks ATF4 märklaudgeenide seondumiselemendiks) järjestusega (Ord & Ord, 2003) ning CHOP valgu aminohapped, mis on olulised TRIB3 seondumiseks, ei ole olulised DNA-ga seondumise aktiveerimiseks (Ohoka jt., 2007). Võimalik, et TRIB3 mõjutab ATF4 ja CHOP transkriptsioonifaktorite seondumist nende funktsioneerimiseks vajalike koaktivaatorite või korepressorite seondumise kaudu (Jousse jt., 2007; Ohoka jt., 2005; Ord & Ord, 2005).



Joonis 2. TRIB3 interaktsioonid ATF4 ja CHOP valguga. ATF4 ja CHOP aktiveerivad imetajaraku stressivastuse käigus *TRIB3* geeni transkriptsiooni, seondudes C/EBP-ATF järjestusele. ATF4 aktiveerib omakorda CHOP-i. TRIB3 inhibeerib valk-valk interaktsiooni kaudu nii ATF4 kui CHOP aktiivsust.

1.3. Apoptoos ehk programmeeritud rakusurm

Apoptoos on aktiivne rakusurma mehhanism, mis osaleb organismi normaalse füsioloogia tagamisel ning on oluline näiteks immuunsüsteemi reguleerimises ja ka embrüonaalses arengus. Apoptoos on lisaks oluline mehhanism kahjustunud rakkude eemaldamiseks. Häired programmeeritud rakusurma mehhanismides, mis viivad apoptoosi suurenemise või vähenemiseni, võivad viia paljude haiguste tekkeni (Elmore, 2007). Protsessi viivad läbi grupp tsüsteiinproteaase, mida nimetatakse kaspasideks. Programmeeritud rakusurm on geneetiliselt kontrollitud ja sellele on iseloomulik tsütoplasma ja tuuma kokkutõmbumine, kromatiini kondenseerumine ja fragmentatsioon ning raku lagunemine apoptootilisteks kehakesteks. Imetajarakkudes on kaks peamist signaliseerimisrada, mis apoptoosi algatavad: sisemine (*intrinsic pathway*) ja välimine (*extrinsic pathway*) (joonis 3). Välimise raja aktiveerimist vahendavad nn “surmareseptorid” (DR *death receptors*) ning sisemise raja aktiveerumine toimub mitokondri vahendusel. Välimine rada aktiveeritakse siis, kui TNF-superperekonna liikmed, FAS-ligandid või TRAIL valgud agregeeruvad (trimeriseeruvad) DR-le, mis põhjustab retseptori intratsellulaarsete surmadomeenide (DD *death domains*) trimeriseerumise. Seejärel adaptorvalk FADD aktiveerib surma efektordomeeni (DED ehk *death-effector domain*) vahendusel inaktiivse prokaspas-8. Aktiveeritud kaspas-8 (initsiaatorkaspas) viib kaspas-3,-6 ja -7 (nn. efektorkaspasid) aktiveerumiseni, mis viib raku lagundamisele. Sisemine apoptoosi rada aktiveeritakse hüpoksia, DNA kahjustuste, rakutsükli defektide ja teiste rakustresside korral. Selle raja korral aktiveeritakse B-rakuline lümfoom 2 (Bcl-2) superperekonna pro-apoptootilised faktorid, mis põhjustab mitokondrist apoptootiliste faktorite vabanemise (nt. tsütokroom c) tsütosooli. Tsütokroom c vabanemine toob kaasa kaspas-9 (initsiaatorkaspas) aktiveerumise. Kaspas-9 aktiveerib efektorkaspasid (Fesik, 2005).

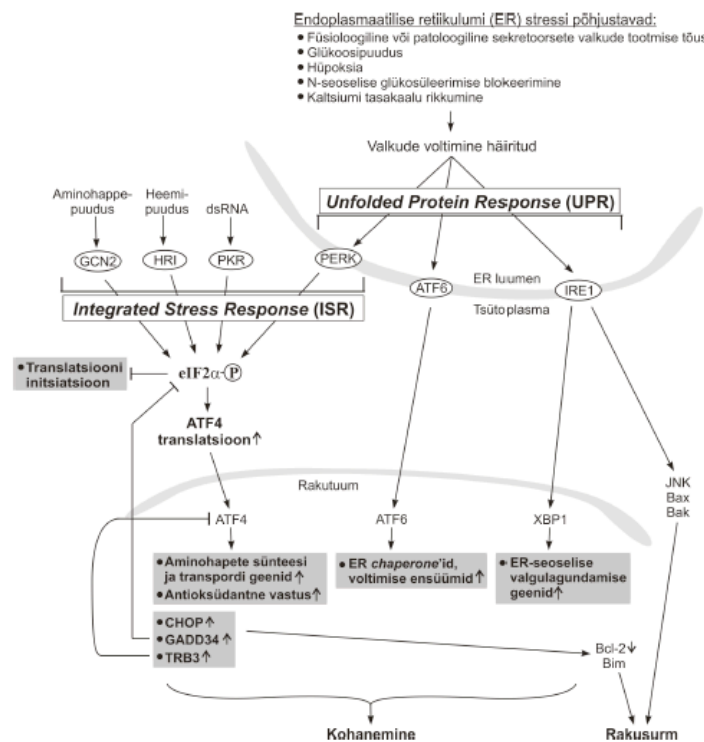


Joonis 3. Apoptoosi algatamise lihtsustatud skeem. Fesik (2005) järgi, modifitseeritud.

1.4. Imetajaraku stressivastus ja TRIB3 stressivastuse reguleerijana

1.4.1. Integreeritud stressivastus (ISR) ja voltimata valkude vastus (UPR)

Voltimata valkude vastus (UPR) ehk ER stressivastus aktiveeritakse imetajarakkudes paljude stiimulite korral, mis põhjustavad häireid valkude pakkimises. UPR-iga kaasneb translatsioonifaktori eIF2 α inhibeerimine nagu on kujutatud joonisel 4. eIF2 α inhibeeritakse eritüübiliste stressorite korral ning stressivastuste signaaliradade koondumist eIF2 α rajale nimetatakse integreeritud stressivastuseks (ISR). eIF2 α fosforüleerimine inhibeerib üldise translatsiooni ning indutseeritakse spetsiifiliselt ATF4 ekspressioon. Imetajarakkudes teostavad eIF2 α fosforüleerimist neli kinaasi: GCN2 (*general control non-derepressible-2*), HRI (*heme-regulated inhibitor*), PKR (*protein kinase double-stranded RNA-dependent*) ja PERK (*PKR-like ER kinase*), mis aktiveeritakse erinevate stiimulite mõjul (Donnelly jt., 2013). Lisaks PERK rajale aktiveeritakse voltimata valkude vastuse korral ATF6 ja IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) (Kim jt., 2008).



Joonis 4. Stressivastuse rajad, milles TRIB3 osaleb. ER stressi põhjustavate stiimulite tulemusena võib häiruda valkude voltimine ER-is ning seetõttu aktiveeritakse voltimata valkude vastus ehk UPR (*unfolded protein response*). ER membraanis paiknevad sensorvalgud PERK, ATF6 ja IRE1 aktiveerivad UPR-i. PERK sensori aktiveerimine põhjustab eukarüootse translatsiooni initsiatsioonifaktori 2α (eIF2α) fosforüleerimise. eIF2α inhibeeritakse eritüübiliste stressorite korral ning stressivastuste signaaliradade koondumist eIF2α rajale nimetatakse integreeritud stressivastuseks (ISR *integrated stress response*). See biokeemiline sündmus toob kaasa üldise translatsiooni inhibeerimise ja spetsiifilise ATF4 ekspressiooni induktsiooni. ATF4 ekspressiooni induktsiooni tulemusena aktiveeritakse TRIB3, CHOP ja GADD34 geenide ekspressioon, mis osalevad eIF2α-ATF4 signaaliharu reguleerimisel. Kui kohanemistavastusega ei õnnestu stressi lahendada, siis aktiveeritakse rakusurma programm. Joonis Daima Õrdi doktoritöö (2008).

1.4.2. ER stressi poolt põhjustatava rakusurma mehhanism

Voltimata valkude vastus aktiveeritakse siis, kui endoplasmaatilises retikulumis on valkude voltimine häiritud ning selle eesmärgiks on ER-i talitluse taastamine. Kui endoplasmaatilise retikulumi normaalset toimimist ei suudeta pika aja jooksul taastada, siis sellisel juhul aktiveeritakse rakusurma programm (Kim jt., 2008). Rakusurma programmi aktiveerumine eIF2α-ATF4 raja kaudu sõltub selle raja märklaud-valkudest TRIB3 ja CHOP. CHOP on pro-apoptootiline transkriptsioonifaktor ning *Chop*^{-/-} genotüübiga hiire embrüonaalsetes fibroblastides ja neerudes esineb vähem apoptoosi vastusena ER stressile (Zinszner jt., 1998). On näidatud, et CHOP kutsub apoptoosi esile anti-apoptootilise Bcl-2 ekspressiooni inhibeerimise ja pro-apoptootilise Bim ülesreguleerimise kaudu (McCullough jt., 2001; Puthalakath jt., 2007).

1.4.3. TRIB3 kui imetajaraku stressivastuse moduleerija

TRIB3 võib moduleerida imetajaraku stressivastust inhibeerides ATF4 või CHOP. CHOP on ER stressi tingimustes pro-apoptootiline transkriptsioonifaktor ning CHOP valgu inhibeerimine võib parandada rakkude elulemust (Yamaguchi & Wang, 2004). Nagu on näidatud joonisel 2, reguleerib TRIB3 transkriptsioonifaktorit ATF4 negatiivse tagasiside teel (Ord & Ord, 2003; Ord & Ord, 2005). ATF4 märklaudgeenideks on erinevad stressivastuses osalevad geenid ning seeläbi võib TRIB3, kui ATF4 repressor, osaleda stressireaktsioonide reguleerimises ning olla üheks võtmevalkudest, mis määrab rakulise vastuse stressireaktsioonidele. ATF4 üleekspressiooni tingimustes toimib TRIB3 elulemust parandava faktorina ning kaitseb HEK293 ja PC12 rakke apoptoosi käivitumise eest. Glükoosipuuduses olevates rakkudes üleekspresseriti ATF4 ning leiti, et TRIB3 koekspressioon vähendab rakkude suremust (Ord jt., 2007). Ord jt. (2007) näitasid samasugust toimimist endogeensete ATF4 ja TRIB3 puhul glükoosipuuduses olevates SaOS2 rakkudes. Sellest võib järeldada, et ATF4 üleekspressiooni tingimustes on TRIB3 antiapoptootiline. Erinevalt eeltoodust on näidatud, et endogeenne TRIB3 võib ER stressi korral HEK293 ja HeLa rakkudes käituda ka pro-apoptootiliselt (Ohoka jt., 2005). Selle põhjal võib arvata, et TRIB3 mõju rakkude elulemusele sõltub stressisignaalide tugevusest, ajast ja rakuliinist.

1.4.4. AMPK endoplasmaatilise retiikulumi stressivastuses

AMP-aktiveeritud proteiinkinaas (AMPK) on raku energia sensor, mis aktiveeritakse AMP taseme suurenemisel rakus (Stein jt., 2000). Stein jt. (2000) on näidanud, et AMPK on heterotrimeerne valk, mis aktiveeritakse α -subühiku fosforüleerimisega treoniin 172 positsioonis. AMPK aktiveerumine toob kaasa kataboolsete protsesside algatamise, mis viib ATP taseme suurenemiseni rakkudes (Hardie jt., 2012). ER stressi tase sõltub rakkude ATP tasemest ja ATP taseme reguleerijana on AMPK seotud ER stressivastuse reguleerimisega. ATP on ER-is vajalik näiteks Ca^{2+} -ATPaaside töös, mis reguleerivad kaltsiumi transporti tsütosooli ja ER-i vahel ning on teada, et AMPK puudumisel on Ca^{2+} -ATPaaside töö häirunud, mille tulemusena indutseeritakse ER stressivastus (Dong jt., 2010).

1.5. Arseniit

Arseniit on looduses laialt levinud kantserogeenne ühend, millega saastunud joogivett tarvitab hinnanguliselt üle 100 miljoni inimese maailmas (Nordstrom, 2002). Kroonilist kokkupuudet arseniidiga seostatakse nahavähiga (Hsueh jt., 1995), kõrgeenenud riskiga haigestuda veresoonkonna haigustesse, nagu näiteks BFD (*black foot disease*) (Tseng, 1989) ja paljude teiste haiguslike seisunditega. Paradoksaalselt on arseniit kasutusel ka kemoterapeutilise ühendina ning seda kasutatakse akuutse müeloidse leukeemia ravis (AML) (Soignet jt., 1998). Arseniidi kantserogeenseid ja anti-kantserogeenseid efekte on palju uuritud ning levinud arvamuse kohaselt on arseniidi toime rakkudele sõltuv kontsentratsioonist, ajast ja koetüübist (Ayala-Fierro jt., 1999).

1.5.1. Arseniidi poolt põhjustatava rakusurma molekulaarne mehhanism

In vitro katsed on näidanud, et arseniit on rakkudele toksiline, põhjustades paljudes rakuliinides programmeeritud rakusurma ehk apoptoosi. Apoptoos algatatakse arseniidistressi korral nii sisemist kui ka välimist signaliseerimisrada aktiveerides. On näidatud, et arseniidistressi korral aktiveeritakse Bcl-2 perekonna pro-apoptoosiliste faktorite ekspressioon ning inhibeeritakse Bcl-2 perekonna anti-apoptoosiliste faktorite ekspressiooni (Yadav jt., 2010). Lisaks on arseniidistressi korral näidatud, et suureneb tsütokroom c vabanemine mitokondrist ning aktiveeritakse kaspas-9 (Chen jt., 1998; Seol jt., 2001). Kaspas-9 märklaud kaspas-3 on samuti arseniidistressi tingimustes aktiveeritud (Weng jt., 2014). On näidatud, et arseniit põhjustab ka kaspas-8 aktivatsiooni, mis on iseloomulik apoptoosi välimisele signaliseerimisrajale (Kim jt., 2014).

1.5.2. Arseniidi poolt indutseeritavad stressid

1.5.2.1. Oksüdatiivne stress

Kirjandusest on teada, et arseniit põhjustab rakkudes oksüdatiivset stressi (Bernstam & Nriagu, 2000). On näidatud, et rakkudes, mida on töödeldud arseniidiga on suurenenud hapniku reaktiivsete ühendite (ROS) hulk (Lu jt., 2011; Yen jt., 2012) ja valkude tiolrühmade oksüdeerumine (Samuel jt., 2005). Tioolrühmasid sisaldavad mitteensümaatilised ühendid, nagu näiteks redutseeritud glutatioon (GSH), on olulised raku normaalse redoks tasakaalu taastamisel ning on leitud, et kõrge GSH tase vähendab arseniidi toksilisust imetajarakkudele (Dai jt., 1999). Samas töös leiti, et rakkude töötlemine glutatiooni sünteesi inhibiitori butioniinsulfoksiimiiniga (BSO) suurendab arseniidistressi korral

apoptoosi. Lisaks on teada, et arseniidistressi korral rakkude töötlemisel antioksidantidega, näiteks N-atsetüültsüsteiiniga (NAC), paraneb rakkude elulemus (Watson jt., 1996). Santra jt. (2007) on näidanud, et NAC vähendab arseniidi poolt põhjustatud oksüdatiivset stressi ja apoptootiliste hepatotsüütide hulka hiire maksas. Sellest järeldub, et arseniidi poolt põhjustatud apoptoos on vähemalt osaliselt tingitud oksüdatiivsest stressist.

1.5.2.2. Genotoksiline stress

Erinevalt paljudest teistest kantserogeensetest ainetest ei ole arseniit mutageen, kuid on näidatud, et arseniit suurendab UV-kiirguse mutageensust (Li & Rossman, 1989). Arseniidi genotoksilisus on põhjustatud tema poolt tekitatud oksüdatiivsest stressist (Li jt., 2001). Li jt. (2001) näitasid, et arseniidistress kahjustab DNA-d ning kui rakke töödelda dimetüülsulfoksiidi (DMSO) või katalaasiga, mis vähendavad ROS hulka, siis DNA kahjustuste arv väheneb. DNA kahjustuste tulemusena aktiveeritakse rakkudes signaaliahela, mis blokeerivad rakutsükli, et võimaldada rakkudel enne replikatsiooni toimumist DNA reparaerida (Kaufmann & Paules, 1996). Arseniidistressi korral on näidatud, et sõltuvalt rakuliinist peatatakse rakutsükkel G1/S faasi üleminekul, G2/M faasi üleminekul või mitoosi faasis (Park jt., 2000).

1.5.2.3. Endoplasmaatilise retiikulumi stress

Kemikaalid, mis põhjustavad oksüdatiivset stressi, indutseerivad sageli ka endoplasmaatilise retiikulumi stressivastuse (Jennings jt., 2013). Paljudes eritüübilistes rakuliinides on näidatud, et arseniit põhjustab apoptoosi ning selle käigus aktiveeritakse ER stressivastuse raja markerid (Lu jt., 2011; Weng jt., 2014; Yen jt., 2012). Weng jt. (2014) näitasid SVEC4-10 rakkudes, et arseniidistressi korral akumulereerub rakkudes kaltsium ning aktiveeritakse eIF2 α -ATF4 ja ATF6 rada, kuid ei aktiveerita IRE1 α -st lähtuvat ER stressivastuse rada. Leiti, et antioksidantsete omadustega ühend α -lipoehape (LA) vähendab ATF4 ja ATF6 aktiveerumist, kuid superoksiidaniooni kõrvaldamine mõju ei avaldanud. Samas töös näidati, et arseniidistressi korral aktiveeritakse CHOP ja TRIB3 ekspressioon. CHOP ekspressiooni aktivatsiooni arseniidistressi tingimustes on näidatud ka pankrease β -rakkudest pärinevas rakuliinis (Lu jt., 2011). Selles töös leiti, et arseniidistressi tingimustes aktiveeritakse ka GPR78 ja GPR94 tsäperonide ekspressioon. Kui rakke töödeldi lisaks arseniidile N-atsetüültsüsteiiniga, siis CHOP, GPR78 ja GPR94 ekspressioon vähenes. Antioksidant NAC-i inhibeerivat mõju ER stressimarkeritele arseniidistressi korral on näidatud ka müoblastides (Yen jt., 2012). Kokkuvõttes viitavad need tööd asjaolule, et lisaks oksüdatiivsele stressile on

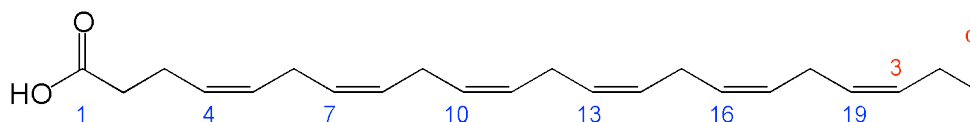
ER stressivastuse aktiveerimine arseniidstressi tingimustes seotud ka teiste, seni teadmata, stressimehhanismidega.

1.6. Polüküllastumata rasvhapped

Polüküllastumata rasvhapped (PUFA) on rasvhapped, mis sisaldavad vähemalt kahte kaksiksidet. Vastavalt esimese kaksiksideme asukohale terminaalse metüülrühma suhtes, klassifitseeritakse PUFA kolme perekonda: oomega-3, oomega-6 ja oomega-9. Oomega-9 perekonna rasvhappeid sünteesitakse imetajates küllastunud rasvhapetest, seevastu oomega-3 ja oomega-6 perekonna rasvhapped kuuluvad asendamatute rasvhapete hulka (Comba jt., 2011).

1.6.1. Oomega-3 rasvhapete hulka kuuluv dokosaheksaeenhape

Dokosaheksaeenhape (DHA), mille struktuur on toodud joonisel 5, on oomega-3 rasvhapete biosünteesi raja lõpp-produkt. Skeemilt on näha, et DHA ahelas on 6 kaksiksidet ning ahel koosneb 22 süsiniku aatomist. Imetajates sünteesitakse dokosaheksaeenhape enamasti eikosapentaehappest (EPA) ning vähesel määral ka α -linoleenhappest, nii EPA kui α -linoleenhappest omandatakse toidust (Pawlosky jt., 2001).



Joonis 5. Dokosaheksaeenhappe struktuur.

Dokosaheksaeenhape on oluline närvikoe membraanide, eriti aju ning silma võrkkesta, koostisosa (Lauritzen jt., 2001). Membraanide ehitusosana mõjutab DHA membraanide omadusi ning vabanemisel membraanide koosseisust käitub DHA kui ligand, seostudes erinevate tuumaretseptoritega (de Urquiza jt., 2000; Gani & Sylte, 2008). Seeläbi võib dokosaheksaeenhape reguleerida rakkude homöostaasi ja paljusid bioloogilisi funktsioone.

1.6.2. Dokosaheksaeenhape vähkkasvajates

Dokosaheksaeenhape on pro-apoptootiline mitmete eritüübiliste vähkkasvajate korral (Calviello jt., 1998; Espada jt., 2007). Espada jt. (2007) manustasid rinnavähi hiirmudelitele n-3 rasvhapete rikast Chia õli (*Salvia hispanica*), mis oli pro-apoptootilise mõjuga vähkkasvajale ning takistas metastaaside teket. On näidatud, et DHA indutseerib apoptoosi ka

hepatokartsinoomis. Calviello jt. (1998) transplanteerisid rottidesse hepatokartsinoomi ning leidsid, et DHA rikastatud dieet pärsib kasvaja arengut ja indutseerib apoptoosi.

Mitmed uurimusgrupid on teatanud, et oomega-3 rasvhapete tarbimine vähendab rinna-, käärsoole-, neeru-, ja eesnäärmevähki haigestumist (Courtney jt., 2007; Fradet jt., 2009; Thiebaut jt., 2009; Wolk jt., 2006). Lisaks on paljudes terapeutilistes uuringutes näidatud, et DHA võib omada vähivastaseid toimeid (Bougnoux jt., 2009; Murphy jt., 2011). Bougnoux jt. (2009) vaatlesid terapeutilistes uuringutes DHA mõju rinnavähi arengule, kus selgus, et DHA suurendab patsientide elulemust. Uuringus manustati kemoteraapiat saavatele patsientidele DHA-d ning vastavalt DHA tasemetele vereplasmas ja punastes vererakkudes jagati patsiendid kahte rühma: kõrge ja madal DHA tase. Rinnavähi patsientidel, kes kuulusid esimesse rühma oli kasvaja progressioon aeglasem ning elulemus kõrgem, võrreldes patsientidega, kelle DHA näitajad vereplasmas ja erütrotsüütides olid madalamad.

1.6.3. Dokosaheksaeenhappe poolt põhjustatava rakusurma molekulaarne mehhanism

Dokosaheksaeenhappe poolt põhjustatud programmeeritud rakusurm algatakse aktiveerides apoptoosi nii sisemist kui ka välimist signaliseerimisrada. Danbara jt. (2004) ning Calviello jt. (2005) on näidanud, et DHA stressi korral aktiveeritakse kolorektaalsetes vähi rakuliinides Bcl-2 perekonna pro-apoptoosilised valgud ning inhibeeritakse sama perekonna anti-apoptoosilisi valke. Lisaks on näidatud, et DHA töötluse korral vabaneb tsütokroom c ning aktiveeritakse kaspaas-9 (Arita jt., 2001). Arita jt. (2001) on näidanud, et DHA stressi korral aktiveeritakse ka apoptoosi välimine signaliseerimisrada, aktiveerides kaspaas-8.

1.6.4. Dokosaheksaeenhappe poolt põhjustatud rakustressid kasvajakudedes

1.6.4.1. Oksüdatiivne ja genotoksiline stress

Kasvajakudedes on kõrgenenud ROS tase võrreldes normaalsete rakkudega ning see on põhjustatud kiiremast metabolismist, mis võimaldab rakkudel kiiremini proliferereeruda (Szatrowski & Nathan, 1991). Selleks, et kasvajakud saaksid sellistes tingimustes ellu jääda ning paljuneda peavad nad ennast kaitsma oksüdatiivse stressi eest. On näidatud, et mõnede onkogeenide transformeeriv aktiivsus on seotud glutatiooni taseme ülesreguleerimisega (Singh jt., 2012).

Dokosaheksaeenhape on tundlik mitteensümaatilisele lipiidide peroksüdatsioonile (Cho jt., 1987). Mitteensümaatiline oksüdatsioon on põhjustatud vabade radikaalidega reageerimisest DHA-ga, mille tulemusena tekib ebastabiilne DHA radikaal. DHA radikaal läbib

isomerisatsioonilised muutused ning tekivad dieenid, mis oksüdeeritakse lipiidseteks hüdroperoksiidideks. Lipiid hüdroperoksiididest tekivad peroksüdatsiooni tulemusena erinevad rakkudele toksilised ühendid, nagu näiteks maloondialdehüüd (MDA) (Siddiqui jt., 2008). MDA on võimeline reageerima DNA-ga, põhjustades erinevaid DNA kahjustusi (Marnett, 1999). On näidatud, et DHA aktiveerib vabade radikaalide tootmist kontsentratsioonist sõltuvalt ning DHA töötuse järgselt väheneb glutatiooni tase rakkudes rohkem kui 60 % (Hossain jt., 2009; Merendino jt., 2005). Seetõttu kuna kasvajarakkudes on võrreldes normaalsete rakkudega kõrgenenud ROS tase, siis võib see viia DHA mitteensümaatilise lipiidide peroksüdatsioonini ning see toob kaasa kõrgenenud ROS taseme rakkudes. See omakorda võib põhjustada DNA kahjustusi ning käivitada kasvajarakkudes apoptoosi.

1.6.4.2. Endoplasmaatilise retiikulumi stress

Dokosaheksaeenhape töötuse korral on näidatud ER stressivastuse signaliseerimisrajaga seotud geenide ekspressiooni aktivatsiooni (Crnkovic jt., 2012; Jakobsen jt., 2008). Jakobsen jt. (2008) leidsid, et DHA indutseerib ER stressi inimese käärsoolevähi rakkudes, aktiveerides ER stressi sensoreid PERK, ATF6 ja XPB1. Samas leiti, et töös uuritud DHA kontsentratsioonid ei põhjustanud rakkudes apoptoosi. Crnovic jt. (2012) näitasid hPASM (human pulmonary artery smooth muscle cells) rakukultuuris, et DHA põhjustab eIF2 α fosforüleerimist, mis toob kaasa rakkude apoptoosi. Leiti, et DHA töötuse korral on ER stressivastuse raja markerite induktsioon põhjustatud vabade radikaalide hulga tõusust.

2. Eksperimentaalne osa

2.1. Töö eesmärgid

TRIB3 ekspressioon aktiveeritakse eritüübiliste rakustresside korral. Näiteks on Ord jt. (2009) näidanud, et *TRIB3* ekspressioon aktiveeritakse arseniidistressi tingimustes HepG2 rakkudes. Lisaks on *TRIB3* ekspressiooni induktsiooni näidatud mitmetes käärsoolevähi rakuliinides dokosaheksaeenhappe töötamise korral (Jakobsen jt., 2008). Kuna *TRIB3* on seotud raku stressivastuse koordineerimisega, siis võib ta seeläbi mõjutada rakkude elulemust. Seetõttu seati antud magistr töö eesmärkideks:

1. Selgitada, kas *TRIB3* mõjutab HCT-15 käärsoolevähi rakkude elulemust dokosaheksaeenhappe töötamise korral.
2. Uurida, kas *TRIB3* mõjutab hiire embrüonaalsete fibroblastide elulemust arseniidistressi tingimustes.
3. Kui *TRIB3* mõjutab rakkude elulemust eelmainitud tingimustes, siis uurida, milliseid muutusi kutsus *TRIB3* puudumine esile stressivastuse molekulaarses mehhanismis.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Imetajarakkude kultuurid ja kasvatamine

Käesolevas töös kasutati Duke'i kolorektaalse adenokartsinoomi (tüüp C) rakuliini HCT-15 rakke ning metsiktüüpi ja TRIB3 *knock-out* hiire embrüonaalseid fibroblaste (MEF; *Trib3*^{+/+} ja ^{-/-}, vastavalt).

HCT-15 rakke kasvatati RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium 1640*, Gibco) söötmes, millele lisati 10% veise loote seerumit, penitsilliini ja streptomütsiini (mõlemad 100 U/ml) ning L-glutamiini (1X) (kõik tootjalt PAA).

MEF-id valmistati vastavalt 2.2.10 kirjeldatule ning kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) söötmes, millele lisati 10% veise loote seerumit (PAA), penitsilliini ja streptomütsiini (mõlemad 100 U/ml) (PAA), 55 nM β -merkaptopetanool (β -ME) (Sigma) ja asendatavad aminohapped (1X NEAA, PAA). Rakke kasvatati koekultuuritassidel 37 °C juures 5% CO₂ kontsentratsioonil.

2.2.2. Stressivastuse indutseerimine rakkudes

Arseniidistressi uurimiseks MEF-des kasutati naatriumarseniiti (NaAsO₂, Sigma) (lõppkontsentratsiooniga 10 või 15 μ M) või 15 μ M naatriumarseniiti koos N-atsetüültsüsteiiniga (NAC, Sigma) (lõppkontsentratsiooniga 5 mM). Töötlused teostati MEF-de kasvusöötmes (kirjeldatud alateemas 2.2.1), mis ei sisaldanud β -merkaptopetanooli ega asendatavate aminohapete lisandit. Kontrollrakkude kasvusööde vahetati peatükis 2.2.1 kirjeldatud MEF söötme vastu, millest puudusid β -merkaptopetanool ja asendatavate aminohapete lisand. Söötme vahetused tehti ligikaudu 24 tundi pärast rakkude väljakülvi katseplaadile.

Dokosaheksaeenhappest (DHA) tingitud stressi uurimiseks HCT-15 rakkudes kasutati DHA-d (Cayman Chemical) lõppkontsentratsiooniga 75 või 90 μ M. DHA-d lisati HCT-15 kasvusöötmesse (koostis toodud alateemas 2.2.1) ja ligikaudu 24 tundi pärast transfektsiooni vahetati rakkudel sööde DHA-d sisaldava söötme vastu. Kuna DHA alglahus oli valmistatud etanoolis, siis kontrollrakkude sööde vahetati kasvusöötme vastu, mis sisaldas vastavas hulgas etanooli.

2.2.3. HCT-15 rakkude transfekterimine

HCT-15 rakkude transfekterimiseks kasutati Lipofectamine 2000 reagenti (Invitrogen) vastavalt tootja protokollile soovitustele. Rakkude transfekterimine viidi läbi 12-kannustel plaatidel ning rakkude tihedus oli ligikaudu 50% konfluentsusest. *TRIB3* mRNA vaigistamiseks kasutati *Silencer Select siRNA-d* (*sense* ahela järjestus 5'-CCAGCUCCUCUACGCCUUUttt-3' ja *anti-sense* ahela järjestus 5'-AAAGGCGUAGAGGAGCUGGgt-3'). Kontrolliks kasutati *Silencer Select Negative Control #2 siRNA-d*. siRNA lõppkontsentratsioon oli 20 nM (Ambion). Transfekterimisel kasutati RPMI-1640 kasvusöödet, mis on kirjeldatud ptk 2.2.1. Pärast transfekterimist asetati plaadid 37 °C (5% CO₂ kontsentratsioon) inkubaatorisse 24 tunniks. Transfektsiooni efektiivsus fluorestseeruva siRNA-ga hinnates oli ligikaudu 70%. Efektiivsust hinnati fluorestsentsmikroskoobiga CellR (Olympus).

2.2.4. Kondenseerunud kromatiiniga tuumade loendamine

24 tundi pärast stressivastuse indutseerimist aspireeriti rakkudelt sööde ning rakud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi (PFA) lahusega PBS-is, inkubeerides 5 min toatemperatuuril. Seejärel lisati lahusesse fluorestsentsvärvi Hoechst 33342 (lõppkontsentratsioon 10 µg/ml) ning inkubeeriti 15 min. PFA/PBS/Hoechst lahus aspireeriti ning rakkudele kanti peale 1X PBS. Analüüsiks kasutati CellR mikroskoopi (Olympus), kasutades 10X suurendusega objektiivi ning fluorestsentsfiltrit (ergastuskiirus 377/50 nm ja emissioonkiirus 440/40 nm) ja DIC (*Differential interference contrast*) filtrit. Piltide analüüsimine ja rakkude lugemine viidi läbi kasutades Adobe Photoshop tarkvara.

2.2.5. Rakkude elulemuse mõõtmine alamarBlue reagentiga

AlamarBlue on mittetoksiline värvaine, mis oksüdeeritud vormis ei ole fluorestseeruv. Metaboolselt aktiivsetes rakkudes alamarBlue redutseeritakse, mille tulemusena tekib punaselt fluorestseeruv ühend. Fluorestsentsi intensiivsus on proportsionaalne metaboolselt aktiivsete rakkude arvuga. 96-kannusel katseplaadil kasvavate rakkude stressisöötmesse (kirjeldatud ptk 2.2.2) lisati alamarBlue reagenti (Biosource International) suhtega 10:1. Plaati inkubeeriti 1,5 tundi temperatuuril 37 °C ning mõõdeti fluorestsents (ergastuskiirus 545 nm ja emissioonkiirus 595 nm) plaadilugejaga Tecan Infinite 200, kasutades Magellan programmi.

2.2.6. Totaalse RNA eraldamine rakukultuurist

Totaalne RNA eraldati MEF-de korral 12-kannustelt plaatidelt ning HCT-15 rakkude puhul koguti üheks prooviks 3 replikaati 96-kannuselt plaadilt. Rakud lüüsi TRIzol reagentiga (Ambion) vastavalt tootja protokollile. RNA proovide kontsentratsioon määrati spektrofotomeetriliselt 260 nm juures ja puhtust kontrolliti neeldumise suhtega $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, kasutades aparati NanoDrop 1000 (Thermo Scientific), mis enne mõõtma asumist nulliti RNA üleslahustamiseks kasutatud veega. Mõõtmiseks kasutati programmi RNA40.

2.2.7. Totaalse RNA töötlemine DNaaS I-ga

Totaalse RNA proovide puhastamiseks genoomsest DNA-st kasutati DNaaS I-te (Fermentas). Töötlusel kasutati tabelis 2 toodud reaktsioonisegu. Proove inkubeeriti 30 min 37 °C juures. Seejärel inaktiveeriti DNaaS I, lisades 0,9 µl RNAasi-vaba 25 mM EDTA-d (Fermentas) (lõppkontsentratsioon 2,5 mM) ning kuumutati segu 10 min 65 °C juures.

Tabel 2. Reaktsioonisegu koostis totaalse RNA töötlemiseks DNaaS I-ga.

Reagent	Lõppkontsentratsioon
DNaaS I puhver magneesiumkloriidiga (10X) (Fermentas)	1X
RiboLock RNAasi inhibiitor (Fermentas)	1 U/µl
DNaaS I, RNAasi-vaba (Fermentas)	0,5 U/µl
RNA	161,6 ng/µl (MEF) 45 ng/µl (HCT-15)
RNAasi-vaba vesi	Kuni lõppruumalani 9 µl

2.2.8. cDNA esimese ahela süntees

cDNA sünteesiks kasutati MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) pöördtranskriptaasi (Solis BioDyne), millelt on punktmutatsiooni abil eemaldatud RNAas H aktiivsus. Reaktsioonisegu (tabel 3) inkubeeriti termotsükleris vastavalt tabelis 4 toodud programmile.

Tabel 3. cDNA esimese ahela sünteesil kasutatud reaktsioonisegu

Reagent	Lõppkontsentratsioon
Reaktsioonipuhver I (5X) (Solis BioDyne)	1X
RiboLock RNAasi inhibiitor (Fermentas)	1 U/ μ l
dNTP segu (Solis BioDyne)	1 mM (iga dNTP)
Oligo-dT ₍₁₈₎ praimer (DNA Technology A/S)	12,5 ng/ μ l (MEF) või 10 ng/ μ l (HCT-15)
Juhuslikud DNA heksameerid (Fermentas)	10 ng/ μ l (MEF) või 4 ng/ μ l (HCT-15)
Totaalne RNA	138 ng/ μ l (MEF) 27 ng/ μ l (HCT-15)
MMLV pöördtranskriptaas (RNAas H-) (Solis BioDyne)	10 U/ μ l
Nukleasivaba vesi	Lõppruumalani 10 μ l

Tabel 4. Pöördtranskriptsiooni reaktsiooni programm

Toiming	Temperatuur	Aeg
Praimerite esmane seondumine	25 °C	10 min
Süntees	37 °C	25 min
Süntees	42 °C	25 min
Süntees	45 °C	10 min
Süntees	48 °C	10 min
Inaktivatsioon	75 °C	10 min

Sünteesitud cDNA säilitati edaspidiseks kasutamiseks -20 °C külmkapis.

2.2.9. Reaalaja PCR

Reaalaja PCR-i teostamiseks kasutati HOT FIREPol EvaGreen qPCR (quantitative polymerase chain reaction) Master Mix Plus (ROX)-i (Solis BioDyne), mis sisaldab SYBR Green I analoogi EvaGreen. EvaGreen võimaldab jälgida kaheaahelise DNA teket reaktsioonis. Lisaks sisaldab antud *master mix* passiivset referentsvärvi ROX, mis on vajalik *master mixi* hulga normaliseerimiseks.

Reaktsioonide lõppruumala oli 10 μ l ning see sisaldas 1X *master mixi*, MEF cDNA-d 15 ng (lõppkontsentratsioon 1,5 ng/ μ l) või HCT-15 cDNA-d 8,1 ng (lõppkontsentratsioon 0,81 ng/ μ l), praimereid 200 nM ning vett lõppruumalani. Oligonukleotiidide järjestused on toodud tabelis 5. Tulemuste kvantifitseerimiseks kasutati suhtelise standardkõvera meetodit. Standardkõverate kontsrueerimiseks vajalikud lahused olid valmistatud varasemalt ning sisaldasid järjestikuste 10-kordsete lahjendustena 10⁷ kuni 10² koopiat vastava ampliconi PCR-i produkti. Standardkõverate R-ruudu väärtused olid üle 0,999 ja kõik uuritavad proovid paiknesid vastava kõvera ulatuses. Uuritavad reaktsioonid mõõdeti triplikaatidena ning mõõtmistulemuste analüüsimisel on arvestatud triplikaatide keskmisi. Standardkõverate

reaktsioonid tehti kaks reaktsiooni punkti kohta. Teostati ka negatiivsed kontrollreaktsioonid, kuhu ei lisatud matriitsi, et tuvastada praimerid dimeeride ja matriitsiga saastumise puudumist. qPCR-i läbiviimiseks kasutati aparati 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Kasutati programmi 95°C 15 min, 40 tsükli: 95°C 15 sekundit, 60°C 60 sekundit. Lõpus koostati sulamiskõver, millega kontrolliti amplifikatsiooni spetsiifilisust.

Tabel 5. qPCR-il kasutatud oligonukleotiidid.

Oligonukleotiidi		
Geen	number	Järjestus (5' → 3')
mTRIB3	#434	CAAGTCGCTCTGAAGGTTCCCTT (R)
	#435	TGGCTGGCAGATACCCATTC (F)
hL7a	#438	CCTAAGAATTTTGGCATTGGACAGGACATCC (F)
	#439	AACCTGATATAGCGGGGCCATTTACAAAAG (R)
mCHOP	#512	CGTTTCCTGGGGATGAGATA (R)
	#513	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC (F)
hTRIB3	#559	CCGATCCCATCTCTGGGAGGCT (F)
	#561	CAGAGGCAGGAGAAGGCTTGGAGC (R)
mL7a	#597	CCACAGGAAGACATGCACCACC (F)
	#598	CAGGACGTTGCCTCCCCAGTG (R)
mASNS	#631	TACAACCACAAGGCGGTACA (F)
	#632	AAGGGCCTGACTCCATAGGT (R)
m - <i>mouse</i> (hiire geen)		
h - <i>human</i> (inimese geen)		
F - <i>forward</i> ehk <i>sense</i> praimer		
R - <i>reverse</i> ehk <i>anti-sense</i> praimer		

2.2.10. Hiire embrüonaalsete fibroblastide tegemine

Trib3 geeni suhtes heterosügootsed C57BL/6J hiired ristati ning tiined emased hukati CO₂-ga raseduse 13,5 päeval. Embrüod eraldati ja neilt eemaldati lootekestad, kopsud, soolestik, maks ja pea. Embrüote ettevalmistamist teostas Sulev Kuuse. Ülejäänud kude tõsteti 10 cm Petri tassile 1X PBS-i ning peenestati steriilse skalpelli abil, inkubeeriti 5 min 0,05% trüpsiiniga 37 °C juures ning suspendeeriti pipetiga. Seejärel segu tsentrifuugiti (200 g 5 min) ning rakud resuspendeeriti 2.2.1 kirjeldatud söötmes ning külvati 6 cm tassidele. Embrüote genotüüpiseerimine teostati laborikaaslaste poolt.

2.2.11. Valkude elektroforees

Arseniidiga töödeldud MEF-id lüüsi 2x SDS lüüsi puhvril (100 mM TrisHCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% glütserool, 10 mM NaF). Valgu kontsentratsiooni mõõtmiseks lüsaadis kasutati *BCA Protein Assay Reagent Kit-i* (Pierce) vastavalt tootja protokollile. Absorptsiooni mõõdeti 540 nm juures plaadilugejaga Tecan Infinite 200, kasutades programmi Magellan. BSA tulemuste põhjal tehti kaliibergraafik, mille alusel arvutati valgu kontsentratsioon lüsaadis. Enne geelile kandmist lisati valguproovile 20 mM DTT ja 0,2% broomfenoolsinine. Proove kuumutati 5 min 100°C juures ja tsentrifuugiti lauatsentrifuugil 16060 g 3 min. Valguproovi kanti rajale 30 µg. Geelelektroforees teostati 10% SDS-polüakrüülamiidgeelis 1X SDS jooksupuhvril (0,125 M Tris, 0,96 M glütsiin, 0,5% SDS) 45 min pingel 190 V. Elektroforeesil kasutati vertikaalset foreesiaparaati (Bio-Rad). Valkude molekulmass määrati markeri *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas) abil. Valgu pealekande hindamiseks värviti geel *Coomassie Brilliant Blue* lahusega.

2.2.12. Western blot

Lahutatud valkudega SDS-PAAG geeli inkubeeriti 30 min ülekandepuhvril (48 mM TRIS, 39 mM glütsiin, 0,04% SDS, 20% etanool). Valgud kanti üle *Hybond ECL* nitrotselluloosfiltrile (Amersham Pharmacia Biotech) poolkuiva ülekande meetodil aparaadiga Trans-Blot SD (Bio-Rad Instruments) 25 min jooksul 15 V pinge juures.

Ülekantud valkudega filtrit blokeeriti 60 min 5 ml 5% BSA lahuses (5% BSA, 1X TBS, 0,1% Tween 20). Et tuvastada, kas AMPK α on fosforüleeritud positsioonis Thr172, kasutati primaarse antikehana hiire p-AMPK(Thr172) vastast küüliku IgG monoklonaalset antikeha (Cell Signaling Technology). Filtrit inkubeeriti primaarse antikehaga (lahjendus 1:3000) 5% BSA lahuses 60 min. Seejärel filtrit pesti 3 korda 5 min pesupuhvriga (1X TBS, 0,1% Tween-20). Sekundaarse antikehana kasutati küüliku IgG vastast peroksüdaasiga konjugeeritud antikeha (Cell Signaling Technology), mida lahjendati (1:10000) 5 ml 5% BSA lahuses. Filtrit inkubeeriti 60 min ja pesti 5 korda 5 min pesupuhvriga. Signaali detekteerimiseks kasutati *ECL Plus Kit-i* (Amersham Biosciences) vastavalt tootja soovitudele. Signaal eksponeeriti röntgenfilmile (Fuij). Kõik protseduurid viidi läbi toatemperatuuril.

2.2.13. Rakutsükli analüüs läbivoolu tsütomeetril

Hiire embrüonaalseid fibroblaste kasvatati 6-kannustel plaatidel ning töödeldi 20 tundi arseniidiga (v.a kontrollrakud, mida arseniidiga ei töödeldud). Rakutsükli uurimiseks koguti kokku sööde ja trüpsiniseeriti kinnitunud rakud (0,05% trüpsiin/1X PBS 2:1) ja lisati kogutud söötmele. Rakke tsentrifugiti kiirendusel 200 g 4 min ja aspireeriti sööde. Rakud suspendeeriti 1X PBS-iga, tsentrifugiti (4656 g 1 min), aspireeriti supernatant ja rakud resuspendeeriti PBS-i lahuses, mis sisaldas 0,1% NP-40 (Roche) ja 1 µg/µl DAPI (Sigma). Rakke inkubeeriti 5 min toatemperatuuril ja tõsteti jääle. DAPI signaal mõõdeti FACSAria I (BD Biosciences, NJ, USA) aparaadiga, mida opereeris Dmitri Lubenets (TÜ MRI). Andmete analüüsimiseks kasutati programmi Flowing Software (Turku Bioimaging).

2.2.14. Redutseeritud glutatiooni taseme mõõtmine

MEF-e tihedusega ligikaudu 70% konfluentsusest inkubeeriti 24-kannustel plaatidel 5 tundi söötmes, milles oli või ei olnud arseniit, NAC või BSO (*L-buthionine-S,R-sulfoximine*, Sigma). Redutseeritud glutatiooni tase rakkudes mõõdeti MCB reagenti (*monochlorobimane*, Molecular Probes) abil. MCB reagent difundeerub rakkudesse ja seondub redutseeritud glutatiooniga glutatioon S-transferaasi vahendatud reaktsiooni kaudu, moodustades tugevalt fluorestseeruva ühendi. Rakke inkubeeriti plaadil 40 µM MCB/1X PBS või 1X PBS lahusega 30 min 37°C juures. Kõikides kannudes vahetati inkubatsioonilahus PBS-i vastu ja mõõdeti fluorestsents (ergastuskiirus 360 nm ja emissioonikiirus 465 nm). Mõõtmised teostati plaadilugejaga Tecan Infinite 200, kasutades Magellan programmi. Rakkude hulga hindamiseks lüüsi rakud kannus 0,1 M NaOH lisamisega ning määrati kogu valgus hulk kannus, kasutades *BCA Protein Assay Reagent Kit-i* (Pierce) vastavalt tootja protokollile. MCB fluorestsentsi intensiivsus korrigeeriti rakkude autofluorestsentsi suhtes ja normaliseeriti kannu kogu valgus hulk suhtes.

2.2.15. Valgusünteesi kiirus

6-kannustel plaatidel kasvatatud rakkudele lisati 15 µM arseniiti sisaldav sööde või vastav kontrollsööde ning inkubeeriti 3 või 10 tundi 37°C ja 5% CO₂ juures. Rakud märgistati 20 µM Pro-mix ³⁵S-metioniini ja -tsüsteiini seguga (Amersham Biosciences) ning inkubeeriti 30 min 37°C 5% CO₂ kapis. Järgnevalt pesti rakke PBS-ga, rakud trüpsiniseeriti, koguti kokku ning lüüsi 200 µl RIPA puhvriga. Filterpaberid blokeeriti blokeerimislahusega (0,1% L-metioniin (Sigma) ja 0,1% L-tsüsteiin (Sigma)). Seejärel pipeteeriti 15 µl lüsaati filterpaberitele (kontrollidele 15 µl RIPA puhvrit) ning filtrid kuivatati toatemperatuuril 10 min. Kuivanud

filtrid asetati eeljahutatud 10% TCA-sse ning inkubeeriti jäävannil 20 min. Seejärel keedeti filtreid 5% TCA-s 15 min. Filtreid pesti esmalt 5% TCA-ga ning seejärel 96% etanooliga. Filtreid kuivatati toatemperatuuril 5 min ning kanti 5 ml stintsillatsioonisegusse. Tulemused mõõdeti stsintillatsiooniloendajas Tri-Carb 2800 TR Liquid Scintillation Analyzer (Beckman Coulter), kasutades QuantSmart tarkvara.

Valgu kontsentratsioon lüsaadis määrati *BCA Protein Assay Kit*'ga (Pierce) vastavalt tootjapoolsele protokollile.

2.2.16. Tulemuste statistiline analüüs

Katsetes saadud keskväärtuste erinevuste statistilist olulisust kontrolliti *Studenti t-test* meetodil (kahepoolne, paariviisiline või mitte-paariviisiline). Erinevus tunnistati statistiliselt oluliseks, kui p väärtus oli väiksem kui 0,05.

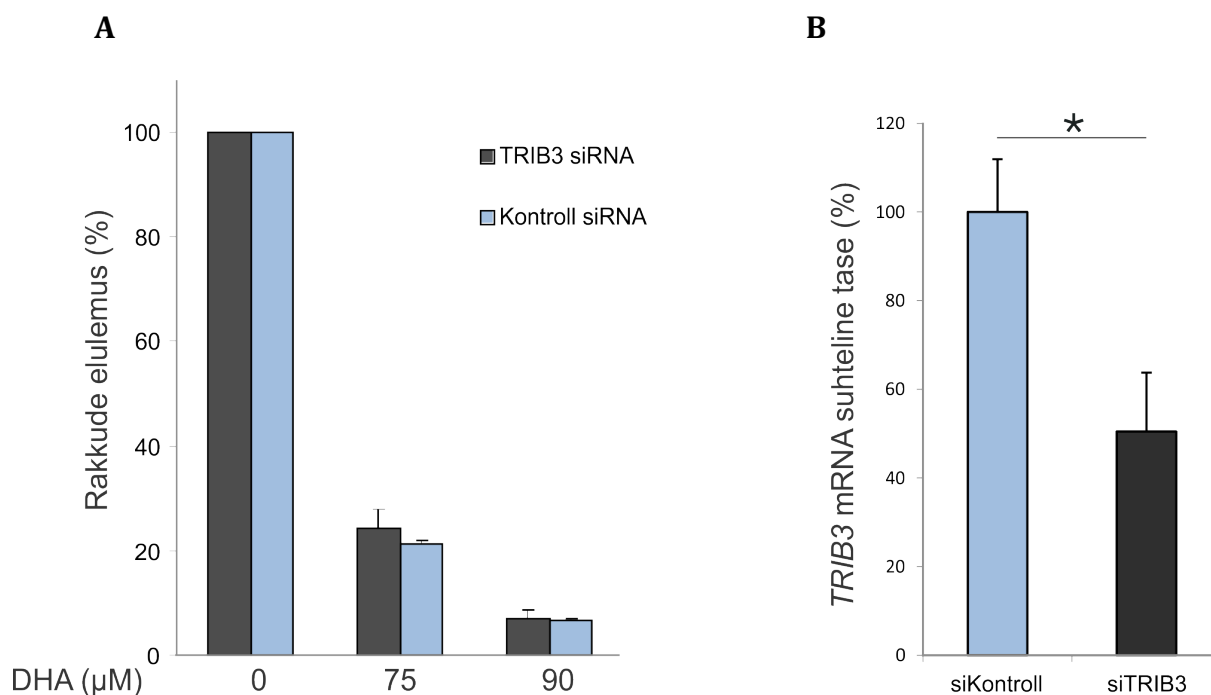
2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. TRIB3 mõju rakkude elulemusele dokosaheksaeenhappest või arseniidist põhjustatud rakustressi tingimustes

Kirjandusest on teada, et DHA ja arseniit indutseerivad eritüübilistes rakuliinides apoptoosi (Calviello jt., 2004; Weng jt., 2014; Yamagami jt., 2009; Yen jt., 2012). Mehhanismid, mille kaudu DHA ja arseniit programmeeritud rakusurma esile kutsuvad, on tänaseks paljuski veel ebaselged. On näidatud, et vastusena DHA- ja arseniidistressile aktiveeritakse ER stressivastuse markergeenid. Üheks, stressivastuse rajaks, mis DHA- ja arseniidistressi korral aktiveeritakse, on eIF2 α -ATF4 rada (Crnkovic jt., 2012; Weng jt., 2014). Mainitud stressivastuse raja aktiveerimisel indutseeritakse *TRIB3* ekspressioon, mis on seotud raku stressivastuse reguleerimisega ning on potentsiaalselt võimeline seeläbi mõjutama rakkude elulemust (Ord jt., 2007).

2.3.1.1. TRIB3 ei mõjuta HCT-15 käärsoolevähi rakkude elulemust dokosaheksaeenhappest tingitud stressi korral

Käärsoolevähi rakkudes on näidatud, et DHA stressi tingimustes aktiveeritakse ER stressivastuse tulemusena rakkudes *TRIB3* ekspressioon (Jakobsen jt., 2008). Selleks, et uurida *TRIB3* mõju HCT-15 rakkude elulemusele DHA stressi korral, viidi läbi RNA interferentsi katse, kus vaigistati *TRIB3* mRNA siRNA-ga. 24 tundi pärast transfektsiooni töödeldi rakke ööpäev DHA-ga ning seejärel lisati rakkudele alamarBlue reagent. Metaboolset aktiivsetes rakkudes alamarBlue redutseeritakse ja moodustub tugevalt fluorestseeruv ühend. Saadud tulemused on toodud joonisel 6A.



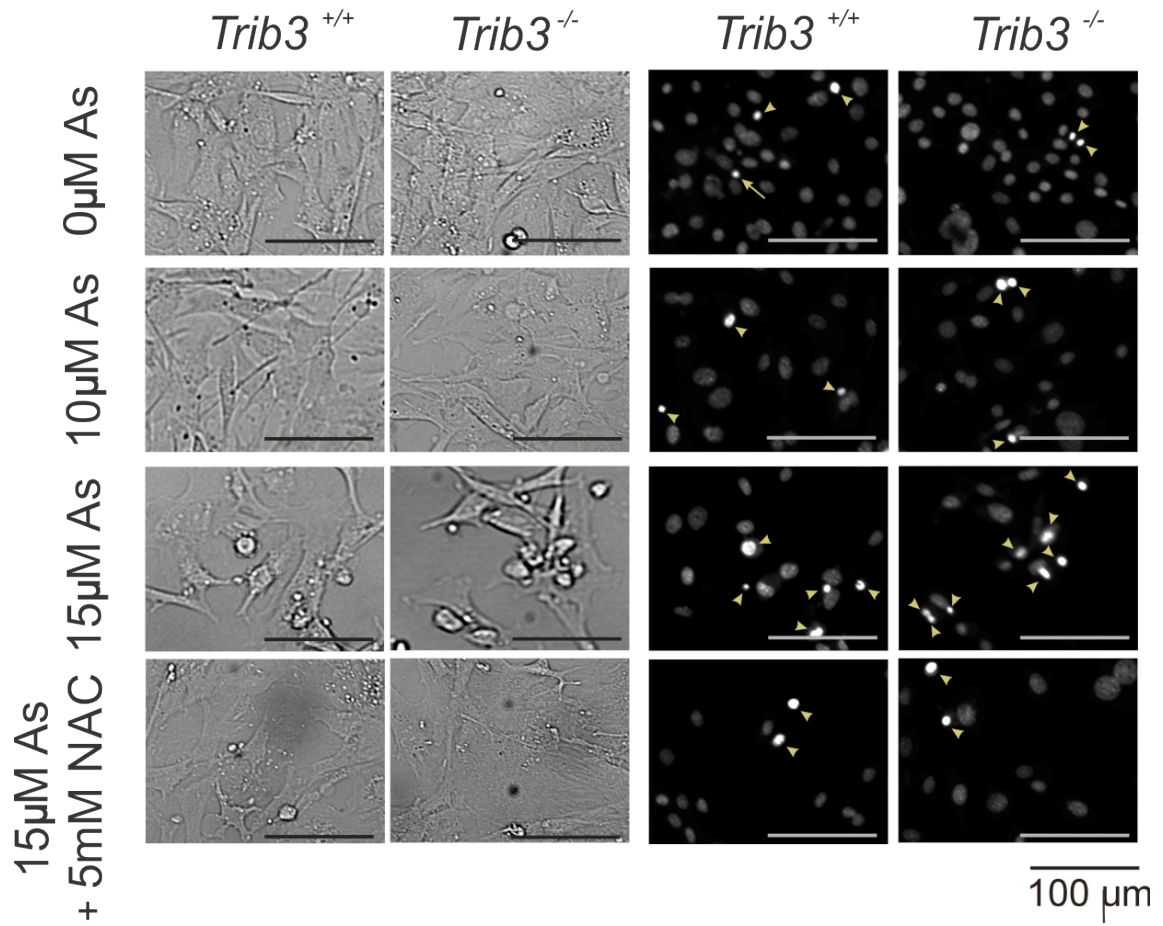
Joonis 6. HCT-15 rakkude elulemus DHA töötuse korral TRIB3-vaigistatud ja -vaigistamata rakkudes (A) ning *TRIB3* mRNA suhteline tase (B). Rakke kasvatati 24 tundi kasvusöötmes ning seejärel teostati transfektsioon. 24 tundi pärast transfektsiooni töödeldi rakke ööpäev 75 μM või 90 μM DHA-ga (v.a kontrollrakke, mida DHA-ga ei töödeldud). Elulemuse määramiseks mõõdeti alamarBlue fluorestseerumise tase kontrollrakkudes (DHA-ga töötlemata, *TRIB3* siRNA-ga vaigistatud või vaigistamata) ning võeti mõõdetud tase 100%-ks ja arutati mitu protsenti sellest moodustab DHA-ga töödeldud rakkude (vastavalt *TRIB3* siRNA-ga vaigistatud või vaigistamata) alamarBlue fluorestsentsi tase. Seejärel eraldati DHA-ga töötlemata rakkudest RNA ning määrati *TRIB3* mRNA suhteline tase. Vearibad märgivad standardhälvet. **A** Kokku on võetud kahe katse keskmised tulemused (iga tingimust 6 replikaati). **B** Graafik on konstrueeritud kahe katse keskmiste tulemuste põhjal. Proovid tehti duplikaatidena, kogudes 3 replikaati üheks prooviks.

Tulemused näitavad, et DHA vähendab HCT-15 rakkude elulemust, mis on kooskõlas varasemalt teiste kolorektaalse vähi rakuliinide kohta avaldatud andmetega (Calviello jt., 2004; Narayanan jt., 2001). Seejuures selgub andmetest, et *TRIB3* vaigistamine ei mõjuta HCT-15 rakkude elulemust antud katse tingimustel. *TRIB3* mRNA suhteliste tasemete mõõtmiseks teostati reaalka PCR, mille tulemused on toodud joonisel 6B. Selgub, et *TRIB3* mRNA tase on *TRIB3* siRNA-ga töödeldud rakkudes 50% vaigistatud võrreldes kontroll siRNA-ga töödeldud rakkudega. Võimalik, et *TRIB3* vaigistamise efektiivsus polnud piisav, et *TRIB3* mõju elulemusele oleks saanud kinnitust leida. Lisaks on teada, et *TRIB3* mõju rakkude elulemusele on konteksti- ja rakuliini-põhine (ptk 1.4.3) ning on võimalik, et mõnes teises kontekstis (nt. teises rakuliinis) reguleerib *TRIB3* DHA stressist põhjustatud ER stressi lahendamist ning seega mõjutab rakkude elulemust.

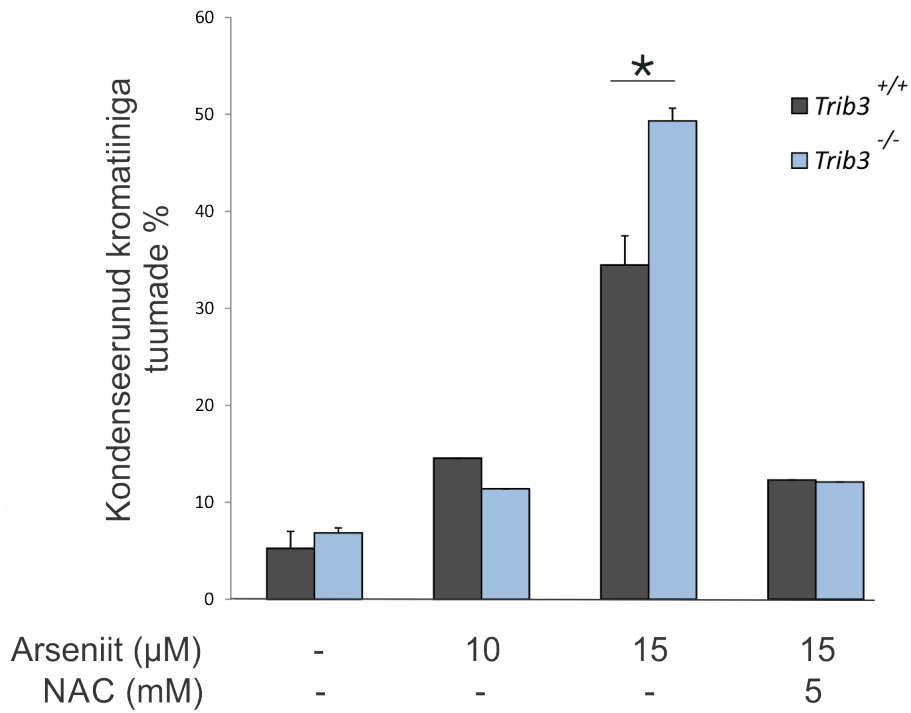
2.3.1.2. TRIB3 suurendab MEF-de elulemust arseniidistressi tingimustes

Järgnevalt uuriti TRIB3 mõju rakkude elulemusele arseniidistressi tingimustes, kasutades 13,5 päeva vanustest hiire embrüotest eraldatud fibroblaste (MEF), mis erinesid *Trib3* geeni olemasolu poolest (*Trib3*^{+/+} või *Trib3*^{-/-}). Areseniidistressi tekitamiseks inkubeeriti MEF-e 10 või 15 µM arseniiti sisaldavas söötmes ning kontrolliks ka 15 µM arseniiti sisaldavas söötmes, kuhu lisati 5 mM antioksidanti NAC. 24 tundi pärast rakustressi indutseerimist vaadeldi rakke mikroskoobis. Vaatlusest selgus, et 15 µM arseniit, kuid mitte 10 µM arseniit, põhjustab hiire embrüonaalsete fibroblastide morfoloogias muutusi (rakud tõmbuvad kerajaks), sõltumata genotüübist (joonis 7A). Järgnevalt lisati rakkudele DNA-ga seonduv fluorestsentsvärv Hoechst 33342 ning vaadeldi rakke fluorestsentsmikroskoobis. Vaatlusest selgus, et arseniidiga töödeldud rakud sisaldavad sageli töötlemata rakkudega võrreldes väiksemaid, intensiivsemalt fluorestseeruvaid rakutuumi, mis viitab kromatiini kondenseerumisele (joonis 7A). Selliste rakutuumadega rakud loeti apoptootilisteks ja apoptootiliste rakkude osakaalu määramiseks loendati kondenseerumata ja kondenseerunud kromatiiniga rakutuumad ning arvutati kondenseerunud rakutuumadega rakkude protsent kogu rakkude hulga suhtes (joonis 7B). Tulemustest ilmneb, et arseniidiga töötlemata *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkude hulgas on apoptootilisi rakke vastavalt 5,3% ja 6,7%. 10 µM arseniidiga töötlemise järel on *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkudest apoptootilised vastavalt 14,6% ja 11,4%. 15 µM arseniidi töötlemise tingimustes on *Trib3*^{+/+} rakkude suremus 34,4% ning *Trib3*^{-/-} MEF-de suremus 49,3%. Tulemus, mis näitab, et *Trib3*^{-/-} MEF-de suremus on 15 µM arseniidi töötlemise korral 14,9 protsenti kõrgem kui *Trib3*^{+/+} MEF-del osutus statistiliselt usaldusväärseks. Antioksidant NAC vähendab rakkude suremust: *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-de suremus 15 µM arseniidi ja 5 mM NAC koosinemise korral on ligikaudu 12%.

A



B



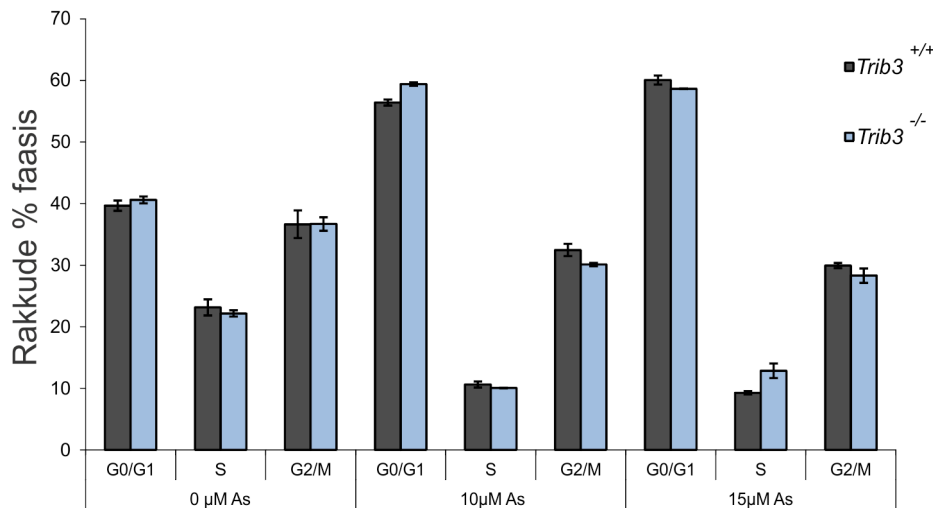
Joonis 7. TRIB3 parandab hiire embrüonaalsete fibroblastide elulemust arseniidistressi tingimustes. Rakke inkubeeriti 24 tundi arseniidi (As) juuresolekul (lõppkontsentratsioon 10 või 15 μM) või töödeldi üheaegselt 15 μM arseniidi ja 5 mM N-atsetüültsüsteiiniga (NAC). Kontrollrakke arseniidi ja NAC-ga ei töödeldud. Seejärel visualiseeriti rakutuomad Hoechst 33342 abil ning loeti kondenseerunud kromatiiniga tuumade arv. Katsed teostati duplikaatides ning korraldi kolm korda (v.a 10 μM arseniidi ja 15 μM arseniidi + 5mM NAC tulemused, mis põhinevad ühel duplikaadil). **(A) Esindavad valgus- ja fluorestsentsmikroskoopia pildid hiire embrüonaalsetest fibroblastidest arseniidistressi tingimustes.** Kollased nooled tähistavad kondenseerunud kromatiiniga rakutuomasid. **(B) Kondenseerunud kromatiiniga tuumade protsent arseniidistressi tingimustes.** Näidatud on arseniidi ja N-atsetüültsüsteiini kontsentratsioonid, millega rakke töödeldi. Y-teljel on näidatud mitu protsenti rakutuomadest oli kondenseerunud kromatiiniga. Vearivad märgivad standardhälvet. * $P < 0,05$ kahepoolne t-test.

Ord jt. (2007) leidsid SaOS2 rakuliinis, et aminohappe leutsiini ja glükoosi puudusest tingitud rakustresside korral vähendab TRIB3 vaigistamine rakkude elulemust. See on kooskõlas antud töös saadud tulemusega, mille kohaselt TRIB3 on arseniidistressi tingimustes MEF-des anti-apoptootiline faktor.

2.3.2. Arseniidistress põhjustab MEF-de kogunemise rakutsükli G0/G1 faasi nii *Trib3* olemasolu kui ka puudumise korral

Arseniit põhjustab muuhulgas genotoksilist stressi ehk tekitab DNA kahjustusi, mis võivad viia rakutsükli blokeerimiseni. Rakutsükli blokeerimise eesmärk on ära hoida kahjustatud või mittetäieliku DNA kandumist tütarakkudesse (Schmitt jt., 2007). On näidatud, et arseniidistress võib sõltuvalt rakutüübist blokeerida rakutsükli G1/S, G2/M või mitootilise faasi kontrollpunktis (McNeely jt., 2008; Park jt., 2000). Seejuures on täheldatud, et rakud, mille rakutsükkel blokeeritakse arseniidistressi tulemusena mitoosis, on suurema suremusega kui rakud, mida arseniidi töötluse korral M-faasis ei peatatud (McNeely jt., 2008). Kuna TRIB3 on võimeline inhibeerima Cdc25 perekonda kuuluvat Cdc25a valku, mis on oluline G1 kontrollpunkti läbimiseks, siis võib *Trib3*^{-/-} rakkudes olla kõrgem Cdc25a tase, mis võib põhjustada G1 faasi kiirema läbimise ning rakkude M faasi jõudmise (Sakai jt., 2010).

Seetõttu uuriti TRIB3 mõju MEF-de rakutsüklile. *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-e töödeldi 20 tundi 10 ja 15 μM arseniidiga või 15 μM arseniidiga, kuhu lisati 5mM NAC, ning määrati rakkude jaotumine rakutsükli faasidesse. Lisaks uuriti rakutsükli arseniidi ja NAC-iga töötlemata kontrollrakkudes. Rakutsükli uurimiseks mõõdeti G0/G1, S ja G2/M faasis olevate rakkude hulk läbivoolutsütomeetriaga (FACS).



Joonis 8. Arseniidistress põhjustab nii *Trib3*^{+/+} kui ka *Trib3*^{-/-} MEF-de kogunemist rakutsükli G0/G1 faasi. Hiire embrüonaalseid fibroblaste töödeldi 10 või 15 μM arseniidiga või 15 μM arseniidiga kuhu lisati 5mM N-atsetüültsüsteiin (NAC). Kontrollrakke arseniidi ja NAC-iga ei töödeldud. Rakke töödeldi 20 tundi. Seejärel võeti rakud trüpsiiniga lahti ja töödeldi NP-40-ga ning värviti DAPI-ga. DNA hulga järgi mõõdeti G0/G1, S ja G2/M faasis olevad rakud FACSria aparatuuriga. Rakutsükli faasis olevate rakkude % leiti kasutades Flowing Software programmi. Toodud andmed on ühe katse duplikaatide keskmised, katset on korratud kaks korda. Vearibad märgivad standardhälvet.

Joonisel 8 esitatud tulemustest ilmneb, et arseniidiga töötlemata *Trib3*^{+/+} rakkudest on G0/G1-faasis 40%, G2/M-s 37% ja S-faasis 23% ning *Trib3*^{-/-} rakkudes on vahetult rakutsükli faaside vahel sarnane metsiktüüpi rakupopulatsioonile. Nii 10 kui ka 15 μM arseniidiga töötlemine suurendab *Trib3*^{+/+} rakkudel G0/G1 faasi osakaalu ligikaudu 60 protsendini kõigist rakkudest ning vähendab G2/M ja S-faasis rakkude osakaalusid (vastavalt ligikaudu 30% ja 10% rakkudest). Arseniidi mõju *Trib3*^{-/-} rakkude rakutsükli faasile on väga sarnane *Trib3*^{+/+} rakkudes esinevale toimele. Nendest andmetest järeldub, et arseniidistressi korral blokeeritakse MEF-de rakutsükli eelkõige G0/G1 faasis ning genotüüpide vahelisi erinevusi rakutsükli faasis pole, mis tähendab, et TRIB3 ei põhjusta rakkude kogunemist kindlasse rakutsükli faasi arseniidistressi tingimustes.

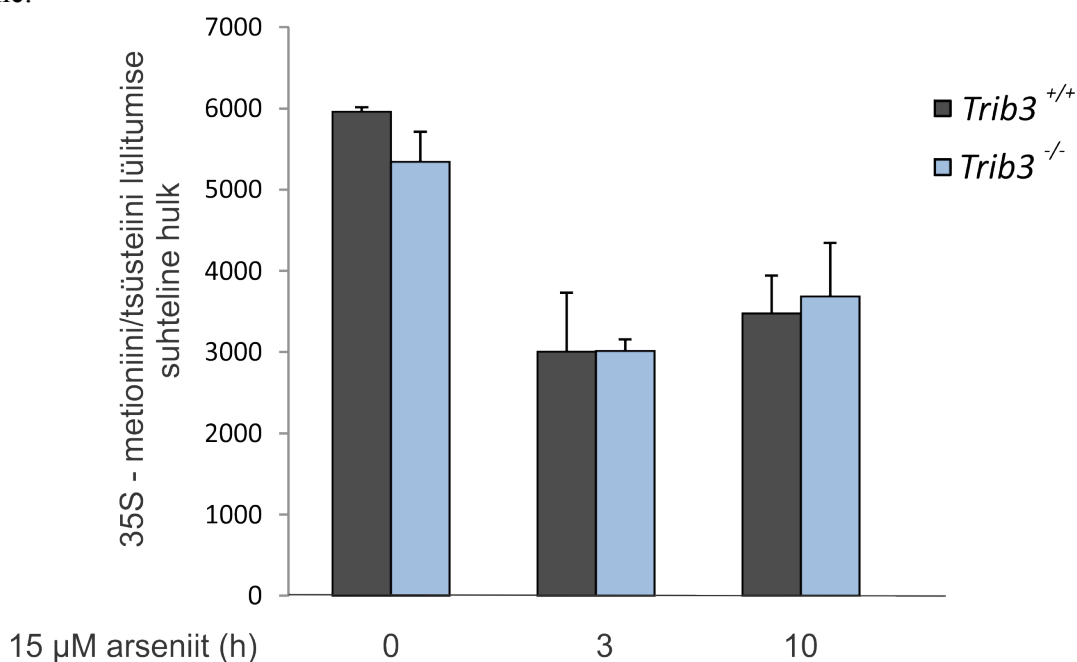
2.3.3. Valgusüntees inhibeeritakse arseniidistressi tingimustes *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkudes sarnaselt

Kirjandusest on teada, et ER stressi tase võib sõltuda valgusünteesi tasemest stressi ajal (Han jt., 2013). Valgusünteesi taseme olulisteks mõjutajateks rakustressi kontekstis on eukarüootses raku näiteks eIF2α ja mTOR rajad.

Eritüübiliste rakustresside korral, mil translatsiooni initsiatsioonifaktor eIF2α fosforüleeritakse, inaktiveeritakse üldine translatsioon, kuid aktiveeritakse spetsiifiliselt ATF4 mRNA translatsioon (Harding jt., 2003). ATF4 aktiveerib *TRIB3* ekspressiooni, mis omakorda negatiivse tagasiside põhimõttel reguleerib ATF4 (Ord & Ord, 2003; Ord & Ord,

2005). Kuna ATF4 inhibeerimine võib takistada eIF2 α reaktiveerimist (mis taaskäivitaks valgusünteesi), siis TRIB3 võib mõjutada valgusünteesi taastamist eIF2 α reaktiveerimise pärssimise kaudu (Novoa jt., 2001). Lisaks võib TRIB3 mõjutada valgusünteesi mTOR raja inhibeerimise kaudu. mTOR raja aktiveerumisel käivitatakse rakkudes valgusüntees ning on näidatud, et üheks mTOR raja aktiveerijaks on Akt/PKB (*protein kinase B*) (Hahn-Windgassen jt., 2005). TRIB3 inhibeerib Akt fosforüleerumist ning on võimalik, et TRIB3 inhibeerib seeläbi ka valgusünteesi (Du jt., 2003).

Järgnevalt uuriti, kas üldine valgusünteesi kiirus arseniidistressi tingimustes on mõjutatud TRIB3 poolt. Selleks inkubeeriti *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-e arseniiti sisaldavas söötmes 3 või 10 tundi ning seejärel märgistati rakke ³⁵S-metioniini ja -tsüsteiiniga söötmes 30 minutit. Rakulise valgu koosseisu liitunud ³⁵S hulk mõõdeti stintillatsiooniloenduris. Radioaktiivse ³⁵S lülitumise väärtused normaliseeriti rakkude kogu valguhulgaga, mis määrati BCA meetodil. Joonisel 9 toodud tulemused näitavad, et 3 ja 10 tunni arseniidi töötuse korral väheneb valgusünteesi kiirus ligikaudu 50% võrreldes kontrolltingimustega (0 h arseniit) ning radioaktiivse metioniini/tsüsteiini lülitumise suhteline hulk on *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkudes võrdne.



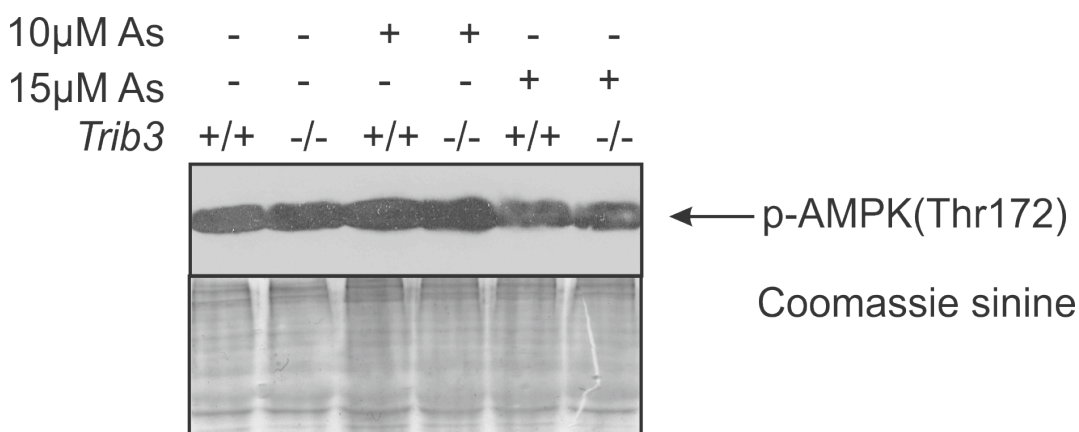
Joonis 9. Valgusünteesi tase arseniidistressi tingimustes. *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-e töödeldi 15 μ M arseniidiga ning joonisel on toodud töötuse aeg tundides (h). Seejärel märgistati rakud ³⁵S-metioniini ja -tsüsteiiniga 30 minutit ning mõõdeti stintillatsiooniloenduris. Rakkude koguvalgu hulk määrati BCA meetodil, mida kasutati ³⁵S-metioniini ja -tsüsteiini inkorporeerumise väärtuste normaliseerimiseks. Andmed on duplikaatide keskmised. Vearibad märgivad standardhälvet.

Katse tulemustest järeldub, et valgusünteesi regulatsioon arseniidistressi käigus on *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkudes sarnane ja seega ei toeta hüpoteesi, et valgusünteesi kõrgem tase põhjustab *Trib3*^{-/-} rakkudes ER stressi vastuse kõrgemat taset.

2.3.4. Fosforüleeritud AMPK tase *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkudes on arseniidistressi tingimustes sarnaselt reguleeritud

Arseniit inhibeerib mitmeid ensüüme, mille tulemusena väheneb rakkudes ATP tase (Samikkannu jt., 2003). ATP taseme vähenemine rakus aktiveerib AMPK-i (AMPK α -subühik fosforüleeritakse positsioonis treoniin 172) (Stein jt., 2000). AMPK-i fosforüleerimine käivitab rakkudes kataboolsed protsessid, mille tulemusena ATP tootmine suureneb. Kuna valkude pakkimine ER-is on ATP-sõltuv protsess, siis võib AMPK kui ATP taseme reguleerija, mõjutada ER stressi vastust (Kaufman jt., 2002). Sellest tulenevalt uuriti AMPK-i aktivatsiooni taset arseniidistressi korral *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-des.

Uuritavaid rakke töödeldi 10 μ M ja 15 μ M arseniidiga 24 tundi ja rakulüsaatides leiduvad valgud lahutati SDS-poliüakrüülamiidgeelis, kanti nitrotselluloosfiltrile ja p-AMPK(Thr172) valgus esinemist filtril kontrolliti fosforüleeritud AMPK vastase anti kehadeaga.



Joonis 10. Fosforüleeritud AMPK α tase arseniidistressi tingimustes. Joonise ülaosas on märgitud 10 ja 15 μ M arseniidiga töötamise olemasolu või puudumine. Positsioonis Thr172 fosforüleeritud AMPK α valgu tase määrati *Western blotiga* ning valgu pealekande hindamiseks värviti geel Coomassie sinisega. Katset korrati 2 korda.

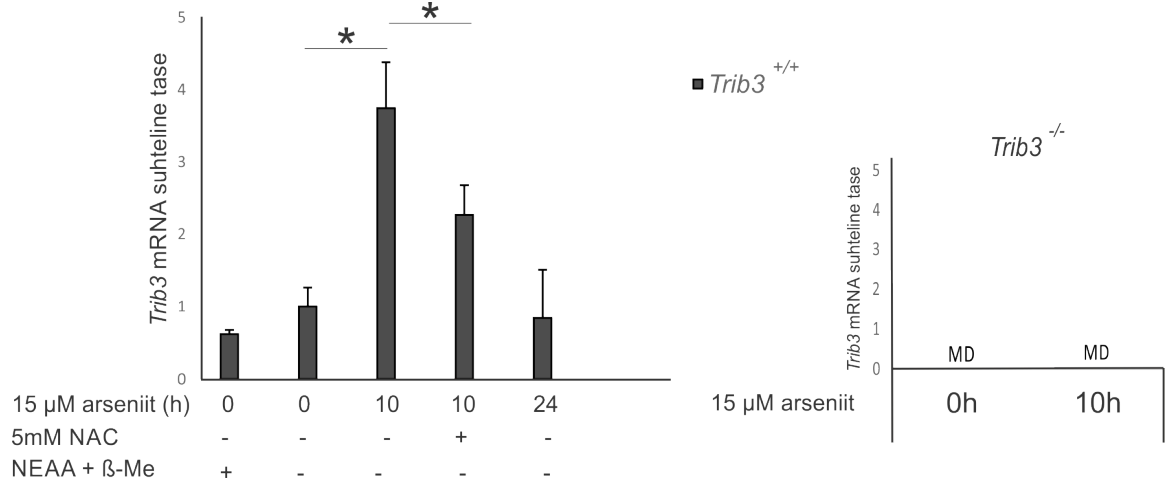
Jooniselt 10 on näha, et p-AMPK(Thr172) tase suureneb 10 μ M arseniidi töötamise korral ning väheneb 15 μ M arseniidi töötamise korral, võrrelduna kontrollrakkudega (arseniidiga töötlemata rakud). *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} rakkudes on p-AMPK(Thr172) tasemed sarnased. Järelikult *Trib3*^{-/-} rakkude kehvem elulemus arseniidistressi korral, võrrelduna *Trib3*^{+/+} rakkudega (2.3.1.2), ei ole põhjustatud AMPK aktiivsuse erinevusest genotüüpide vahel. See tulemus on kooskõlas artikliga, kus leiti, et apoptoosi tekitava kannabinoididega töötamise korral *TRIB3* vaigistamine ei mõjuta p-AMPK(Thr172) taset (Vara jt., 2011). Küll aga leiti viimati mainitud töös, et *TRIB3* mõjutab mTOR raja aktiveerimist, mis on samuti energeetilisele stressile reageeriv faktor ning mis funktsioneerib mõnel juhul paralleelse rajana AMPK-le (nt autofaagia käivitamisel).

2.3.5. Arseniit aktiveerib ER stressiga seotud ATF4-CHOP rada *Trib3*^{-/-} rakkudes tugevamalt kui *Trib3*^{+/+} rakkudes

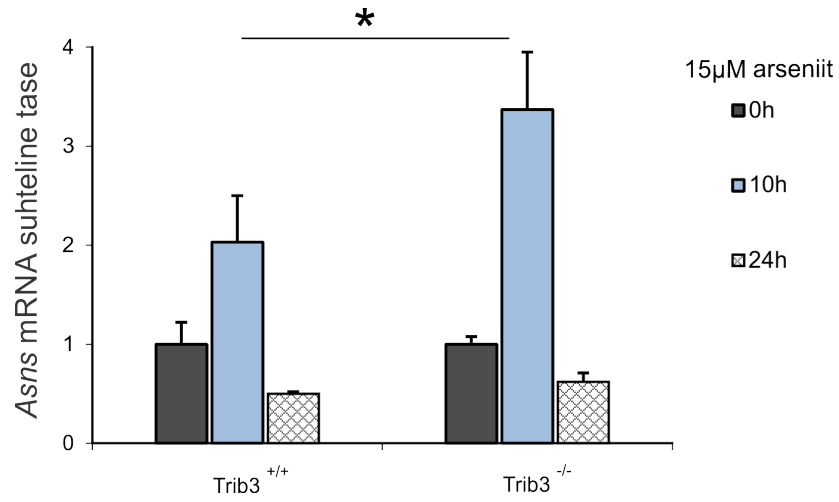
Varasemalt on avaldatud töid, mille kohaselt arseniit tekitab ER stressi ning sellest tulenevalt uuriti, kas arseniit aktiveerib rakkude elulemusega seotud ER stressivastuse rada ATF4-CHOP-TRIB3, rakendades selle raja markergeenide ekspressiooni analüüsi qRT-PCR-i abil. Katsele eelnevalt kasvatati rakke tüüpilises DMEM-il põhinevas MEF-de kasvusöötmes (kirjeldatud 2.2.1), mis sisaldab lisanditena β -merkaptotetanooli (β -ME) ja asendatavaid aminohappeid (NEAA). Kuna β -ME ja NEAA võivad põhjustada rakkude redoks keskkonnas muutusi, siis uuriti arseniidistressi reeglina söötmes, mis mainitud ühendeid ei sisaldanud (nagu kirjeldatud 2.2.2). Et selgitada söötme lisandite β -ME ja NEAA mõju ER stressi basaalsele tasemele, uuriti geeniekspressiooni ka arseniidiga töötlemata rakkudes, mida kasvatati söötmes, mis ei sisaldanud eelmainitud lisandeid. Geeniekspressiooni uurimiseks eraldati rakkudest totaalne RNA ning teostati kvantitatiivse PCR-i katsed.

Oodatavalt on tulemustest näha, et *Trib3*^{-/-} MEF-des ei ole *Trib3* ekspressioon detekteeritav (joonis 11A). Samuti näitavad tulemused, et kui söötmetest eemaldada β -ME ja NEAA, siis aktiveeritakse vähesel määral *Trib3* ja *Chop* ekspressioon (joonis 11A ja C, vastavalt). Lisaks on saadud andmetest näha, et 10-tunnise arseniiditöötamise korral aktiveeritakse rakkudes *Trib3* ekspressioon 3,7x, võrreldes kontrollrakkudega (arseniidiga töötlemata) ning NAC lisamine arseniidistressi söötmesse põhjustab *Trib3* ekspressiooni taseme vähenemist 1,4x, võrrelduna rakkudega, mida töödeldi ainult 15 μ M arseniidiga (joonis 11A). 15 μ M arseniidiga töödeldud rakkudes on 24 tunni pärast *Trib3* mRNA tase langenud tagasi basaalsele tasemele (joonis 11A). ATF4 aktiivsuse uurimiseks arseniidistressi tingimustes mõõdeti asparagiin süntetaasi (*Asns*) mRNA taset, mis on ATF4 poolt reguleeritav mudelgeen (Jousse jt., 2007). Tulemused näitavad, et *Asns* ja *Chop* ekspressioon käitub sarnaselt *Trib3*-ga (joonis 11B ja C). 10 tunni arseniidi töötamise korral ekspressioon aktiveeritakse ning 24 tunnise arseniidi töötamise korral *Asns* ja *Chop* ekspressioon langeb basaalsele tasemele. 10 tunni arseniidi töötamise järgselt indutseeritakse *Trib3*^{+/+} rakkudes *Asns* mRNA ekspressioon 2x ja *Trib3*^{-/-} rakkudes 3,4x, võrreldes vastavates kontrollrakkude (arseniidiga töötlemata) *Asns* mRNA tasemega. *Chop* mRNA tasemete suurenemine samades tingimustes on *Trib3*^{+/+} rakkudes 1,8x ja *Trib3*^{-/-} rakkudes 2,6x, võrreldes *Trib3*^{+/+} kontrollrakkude *Chop* mRNA tasemega. Sarnaselt *Trib3* ekspressiooniga vähendab NAC lisamine arseniidistressi söötmesse *Chop* mRNA taset, võrreldes vastava arseniidistressi söötmega. Tulemused on toodud joonisel 11B ja 11C, vastavalt.

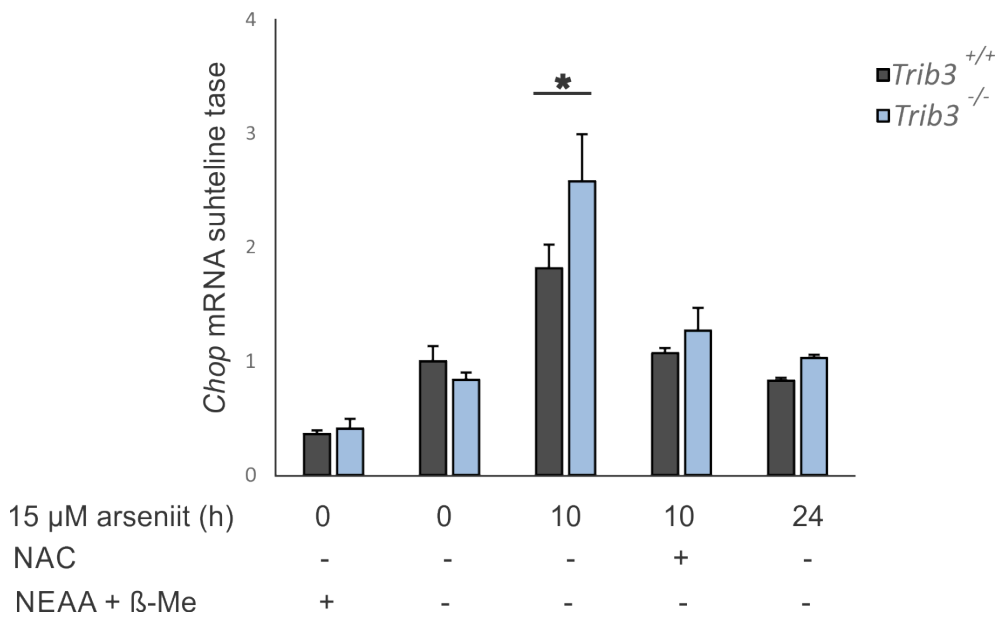
A



B



C



Joonis 11. ATF4-CHOP raja aktiveerumine arseniidistressi tingimustes. *Trib3* (A), *Asns* (B) ja *Chop* (C) mRNA tasemed määrati kvantitatiivse PCR-i meetodil. Tulemused on normaliseeritud *L7a* mRNA taseme suhtes. Töötluste kestvus on esitatud tundides. Vearibad märgivad standardhälvet. (A) Rakke inkubeeriti 15 μ M arseniidiga või 15 μ M arseniidiga, kuhu lisati 5 mM N-atsetüülsüsteiin (NAC). Lisaks on joonisel näidatud *Trib3* ekspressioon rakkudes, mida kasvatati söötmes, mis sisaldas söötmelisanditena asendatavaid aminohappeid (NEAA) ja β -merkaptopetaanooli (β -ME). Tulemused on väljendatud arseniidiga töötlemata rakkude (ilma β -ME ja NEAA) *Trib3* mRNA taseme suhtes. Joonisel on toodud kolme duplikaatidena teostatud katse tulemuste keskmised. * $p < 0,05$ kahepoolne t-test. (B) Rakke töödeldi 15 μ M arseniidiga 10 või 24 tundi. *Asns* mRNA induksioon on väljendatud arseniidiga töötlemata kontrolli suhtes. Tulemused on triplikaatide keskmised ning proovid tehti duplikaatidena. * $p < 0,05$ kahepoolne t-test. (C) Rakke inkubeeriti 15 μ M arseniidiga või 15 μ M arseniidiga, kuhu lisati 5 mM NAC. Lisaks on joonisel toodud *Chop* ekspressioon rakkudes, mida kasvatati söötmes, mis sisaldas söötmelisandina NEAA-d ja β -ME-i. Tulemused on väljendatud arseniidiga töötlemata rakkude (ilma β -ME ja NEAA) *Chop* mRNA taseme suhtes. Tulemused on triplikaatide keskmised ning proovid tehti duplikaatidena. * $p < 0,05$ kahepoolne t-test.

Saadud tulemustest saab järeldada, et *Trib3*^{-/-} MEF-des on arseniidistressi tingimustes ATF4 raja aktivatsioon, mõõdetuna ATF4 sihtmärkgeenide *Chop* ja *Asns* induksioonide põhjal, kõrgem kui *Trib3*^{+/+} rakkudes. Saadud tulemus on kooskõlas varasemate andmetega, mis näitavad, et TRIB3 on võimeline ATF4 aktiivsust inhibeerima eritüübiliste stressorite korral (Ord & Ord, 2003). Kuna CHOP-i peetakse pro-apoptotiliseks transkriptsioonifaktoriks, siis võib *Trib3*^{-/-} rakkude elulemuse vähenemine võrreldes *Trib3*^{+/+} MEF-dega arseniidistressi korral olla põhjustatud CHOP aktiivsuse suurenemisest, mis on tingitud ATF4 suuremast aktiivsusest TRIB3 inhibeeriva efekti puudumisel. Tulemustest selgub veel ka, et antioksidandi NAC lisamise korral on *Trib3* ja *Chop* mRNA tasemed madalamad, võrreldes 15 μ M arseniidiga, kus puudus NAC. See viitab asjaolule, et arseniidistressi korral mõjutavad rakkude vastust stressile mitmed stressimehhanismid (nt. ER, genotoksiline, energeetiline ja ka oksüdatiivne stress), mille koostoimest oleneb raku vastus stressile.

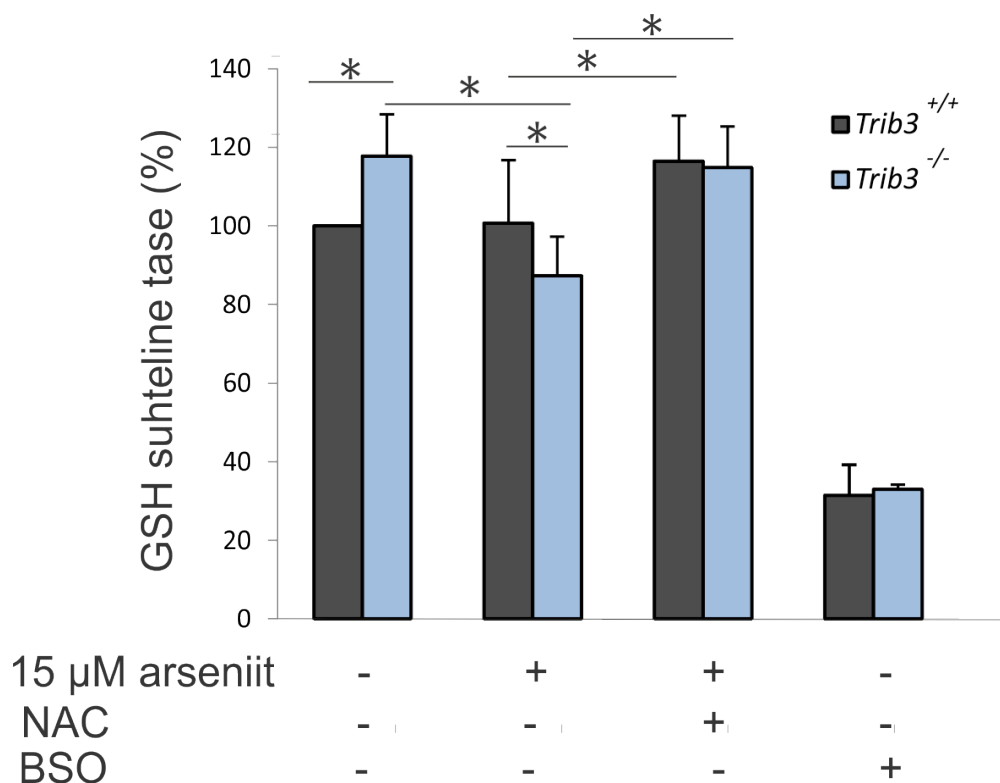
2.3.6. GSH tase arseniidistressi tingimustes on kõrgem metsiktüüpi hiire embrüonaalsetes fibroblastides võrrelduna *Trib3*^{-/-} MEF-dega

Arseniit põhjustab rakkudes muuhulgas oksüdatiivset stressi (Ruiz-Ramos jt., 2009) ning inhibeerib ensüüme seondudes valkude SH-rühmadega (Zhang jt., 2010). Glutatioon on tiolrühmasid sisaldav tripeptiid (γ -glütamüül-L-tsüsteinüül-glütüün), mis on oluline raku redoks homöostaasi reguleerimises. GSH vähendab arseniidi toksilisust rakkudele eemaldades rakkudest vabasid radikaale (Wang jt., 2013) ning seondudes SH-rühmade kaudu arseniidiga (Spuches jt., 2005). GSH-arseniit kompleksi moodustumine on oluline mehhanism, millega arseniit rakkudest välja transporditakse ja sellega väheneb arseniidi kontsentratsioon raku (Cui jt., 2004). GSH tase rakkudes arseniidistressi korral suureneb kui rakke töödeldakse antioksidandi NAC-iga (Chao jt., 2007). Sellest tulenevalt sooviti GSH tasemete regulatsiooni kaudu uurida, kas TRIB3 mõjutab arseniidistressi tingimustes rakkude redoks tasakaalu.

Trib3^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-des indutseeriti arseniidistress, inkubeerides rakke söötmega, mis sisaldas 15 μ M arseniiti. Lisaks teostati kontrollid, kus rakke töödeldi 15 μ M arseniidiga,

kuhu lisati antioksidanti NAC (lõppkontsentratsiooniga 5 mM) või glutatiooni sünteesi inhibiitorit BSO-d (lõppkontsentratsiooniga 0,5 mM). Töötluste kestvus oli 5 tundi ning seejärel lisati rakkudele GSH tasemete mõõtmiseks MCB reagent. MCB difundeerub rakkudesse ja seondub redutseeritud glutatiooniga glutatioon S-transferaasi vahendatud reaktsiooni kaudu ning moodustub tugevalt fluorestseeruv ühend.

Saadud andmetest (joonis 12) ilmneb, et GSH hulk tavatingimustel inkubeeritud *Trib3*^{-/-} rakkudes on 17,7% kõrgem kui *Trib3*^{+/+} rakkudes. Arseniidistressi tingimustes väheneb *Trib3*^{-/-} rakkudes GSH tase ligikaudu 30% võrra võrreldes *Trib3*^{-/-} rakkudega, milles pole indutseeritud arseniidistressi vastus. Samas *Trib3*^{+/+} rakkudes GSH tase arseniidistressi korral on sarnane basaalse tasemega. Lisaks on jooniselt 12 näha, et antioksidandi NAC lisamine põhjustab GSH taseme suurenemist nii *Trib3*^{+/+} kui *Trib3*^{-/-} rakkudes ning seevastu GSH sünteesi inhibiitori BSO lisamine vähendab tugevalt GSH taset.



Joonis 12. Glutatiooni suhteline tase *Trib3*^{+/+} ja *Trib3*^{-/-} MEF-des. Arseniidistressi indutseerimiseks inkubeeriti rakke 15 μM arseniidiga 5 tundi. Kontrollidena teostati töötlus 15 μM arseniidiga, kuhu lisati 5 mM N-atsetüültsüsteiin (NAC), ja töötlus 0,5 mM butioniinsulfoksimiiniga (BSO). Seejärel lisati rakkudele MCB reagent ning mõõdeti fluorestsents. MCB fluorestsents normaliseeriti üldvalgu hulga suhtes. Andmed on esitatud selliselt, et 100% vastab *Trib3*^{+/+} töötluseta rakkude suhtelisele MCB tasemele. Joonisel on toodud viie katse keskmised tulemused. Vearibad märgivad standardhälvet. * tähistab $p < 0,05$ kahepoolne paariviisiline t-test.

Nendest tulemustest võib järeldada, et *Trib3*^{-/-} MEF-des on GSH tase tavatingimustel kõrgem kui *Trib3*^{+/+} MEF-des. Kirjandusest on teada, et subletaalse oksüdatiivse stressi tingimustes suureneb rakkudes GSH süntees (Schuliga jt., 2002). Seetõttu võib GSH taseme suurenemine

tavatingimustel *Trib3*^{-/-} MEF-des viidata oksüdatiivse stressi basaalselt kõrgemale tasemele *Trib3*^{-/-} rakkudes, võrreldes *Trib3*^{+/+} rakkudega. Lisaks on jooniselt 12 näha, et arseniidistressi tingimustes on *Trib3*^{-/-} MEF-des GSH tase madalam kui *Trib3*^{+/+} rakkudes. Sellest võib järeldada, et *Trib3*^{-/-} MEF-des on häirunud rakkude redoks tasakaalu reguleerimine ning GSH madalam tase *Trib3*^{-/-} MEF-des arseniidistressi tingimustes võib olla üks faktoritest, mis panustab rakkude elulemuse vähenemisesse. On näidatud, et ATF4 ja CHOP üleekspressioon põhjustab MEF-des kõrgeks tõusnud ROS-ide taseme (Han jt., 2013). Kuna *Trib3*^{-/-} MEF-des on arseniidistressi korral ATF4 ja CHOP valkude tase kõrgem kui *Trib3*^{+/+} MEF-des (ptk 2.3.5), siis võib *Trib3*^{-/-} MEF-des GSH madalam tase olla tingitud GSH suuremast oksüdeerumisest kõrgeks tõusnud oksüdatiivse stressi tingimustes. Lisaks võib GSH madalam tase olla põhjustatud GSH kiiremast lagunemisest või aeglasemast sünteesist *Trib3*^{-/-} rakkudes. Edasised katsed peavad selgitama, kas GSH taseme suurem langus *Trib3*^{-/-} MEF-des arseniidistressi korral on põhjustatud suurenenud vabade radikaalide hulgast *Trib3*^{-/-} MEF-des või mõjutab *Trib3* puudumine redutseeritud glutatiooni taset reguleerivate ensüümide ekspressiooni ja/või aktiivsust.

KOKKUVÕTE

Trib3 on pseudokinaas, mis on ülesreguleeritud paljudes eritüübilistes rakuliinides ebasoodsate tingimuste mõjul. On teada, et *TRIB3* ekspressioon aktiveeritakse dokosaheksaeenhappe ja arseniidi poolt põhjustatud rakustresside korral. Kuna *TRIB3* interakteerub erinevate valkudega (ATF4, CHOP, Akt/PKB), mis osalevad stressi signaaliradades ning seega mõjutavad rakkude vastust stressile, otsustasime uurida *TRIB3* mõju rakkude elulemusele dokosaheksaeenhappe ja arseniidi põhjustatud rakustresside korral. Eksperimentaalse töö tulemusena selgus:

- *TRIB3* vaigistamine ei mõjuta HCT-15 käärsoolevähi rakkude elulemust dokosaheksaeenhapestressi töötamise korral.
- Endogeenne *TRIB3* suurendab MEF-de elulemust arseniidistressi korral.
- *TRIB3* ei mõjuta arseniidistressist põhjustatud MEF-de kogunemist rakutsükli G1 faasi.
- Arseniidistressi tingimustes inhibeeritakse valgusüntees *Trib3^{+/+}* ja *Trib3^{-/-}* rakkudes samaväärselt.
- AMPK fosforüleerimine on arseniidistressi tingimustes *Trib3^{+/+}* rakkudes samasugune kui *Trib3^{-/-}* rakkudes
- Arseniidistressi korral aktiveeritakse ER stressivastuse ATF4-CHOP rada *Trib3^{-/-}* rakkudes rohkem kui *Trib3^{+/+}* rakkudes.
- *Trib3^{+/+}* MEF-des on arseniidistressi tingimustes GSH tase kõrgem kui *Trib3^{-/-}* MEF-des.

Kokkuvõtteks võib öelda, et *TRIB3* ei mõjuta HCT-15 rakkude elulemust dokosaheksaeenhappe töötamise korral, kuid parandab MEF-de elulemust arseniidistressi tingimustes. Selgus, et *TRIB3* elulemust parandav efekt arseniidistressi korral on seotud ER stressivastuse raja ATF4-CHOP kõrgema aktiveerumisega *Trib3^{-/-}* MEF-des ja raku redoksisundi muutusega.

The role of pseudokinase TRIB3 in cellular response to stress evoked by docosahexaenoic acid or arsenite

Tuuliki Biene

SUMMARY

In response to stressors eukaryotic cells activate a series of signal transduction pathways to regain homeostasis. If these mechanisms are not able to maintain cellular homeostasis cell death is induced.

TRIB3 is a pseudokinase the level of which is increased in response to various stresses. *TRIB3* interacts with several proteins, including ATF4, CHOP and Akt/PKB and through these interactions *TRIB3* has been shown to regulate stress signalling and apoptosis. As *TRIB3* is induced in docosahexaenoic acid stress conditions and arsenite-induced stress response, we decided to determine how *TRIB3* affects cell viability. The following conclusions were drawn from the experiments presented in this thesis.

- *Trib3* deficient (*Trib3*^{-/-}) and wildtype (*Trib3*^{+/+}) MEF have equal viability in docosahexaenoic acid stress conditions.
- *Trib3*^{-/-} MEFs are more sensitive to arsenite induced stress than *Trib3*^{+/+} MEFs.
- Arsenite-induced stress activates G1- phase cell cycle arrest equally in *Trib3*^{+/+} and *Trib3*^{-/-} MEFs.
- Arsenite-induced stress inhibits protein synthesis equally in *Trib3*^{+/+} and *Trib3*^{-/-} MEFs.
- There were no differences in the phosphorylated AMPK levels of *Trib3*^{+/+} and *Trib3*^{-/-} MEFs in arsenite stress conditions
- ATF4-CHOP ER stress pathway is more induced in *Trib3*^{-/-} MEFs compared to *Trib3*^{+/+} MEFs.
- GSH levels were higher in arsenite-treated *Trib3*^{+/+} MEFs compared to arsenite-treated *Trib3*^{-/-} MEFs.

In conclusion, it was found that *TRIB3* does not affect HCT-15 cell viability in docosahexaenoic acid stress conditions, but increases MEF viability during arsenite-induced stress by down-regulating ER stress ATF4-CHOP pathway and by affecting cell redox status.

TÄNUSÕNAD

Tahan tänada enda juhendajat Tiit Ördi abi, kannatlikuse ja silmaringi laiendamise eest. Suurimad tänud ka minu juhendajale Tõnis Ördile, kes andis mulle võimaluse grupis töötada ning aitas mõtete ja soovitustega. Erilised tänusõnad Daima Ördile heade nõuannete, toetuse ja väga meeldiva juhendamise eest.

Veel sooviksin ma tänada oma perekonda, kes mind õpingute jooksul palju toetasid.

KIRJANDUSE LOETELU

Arita K, Kobuchi H, Utsumi T, Takehara Y, Akiyama J, Horton AA, Utsumi K (2001) Mechanism of apoptosis in HL-60 cells induced by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Biochem Pharmacol* **62**: 821-828

Ayala-Fierro F, Barber DS, Rael LT, Carter DE (1999) In vitro tissue specificity for arsine and arsenite toxicity in the rat. *Toxicol Sci* **52**: 122-129

Bernstam L, Nriagu J (2000) Molecular aspects of arsenic stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **3**: 293-322

Bougnoux P, Hajjaji N, Ferrasson MN, Giraudeau B, Couet C, Le Floch O (2009) Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid: a phase II trial. *Br J Cancer* **101**: 1978-1985

Bowers AJ, Scully S, Boylan JF (2003) SKIP3, a novel Drosophila tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene* **22**: 2823-2835

Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, Piccioni E, Serini S, Maggiano N, Tringali G, Navarra P, Ranelletti FO, Palozza P (2004) n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1 α induction pathway. *Carcinogenesis* **25**: 2303-2310

Calviello G, Di Nicuolo F, Serini S, Piccioni E, Boninsegna A, Maggiano N, Ranelletti FO, Palozza P (2005) Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol* **55**: 12-20

Calviello G, Palozza P, Piccioni E, Maggiano N, Frattucci A, Franceschelli P, Bartoli GM (1998) Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *Int J Cancer* **75**: 699-705

Chao PL, Fan SF, Chou YH, Lin AM (2007) N-acetylcysteine attenuates arsenite-induced oxidative injury in dorsal root ganglion explants. *Ann N Y Acad Sci* **1122**: 276-288

Chen YC, Lin-Shiau SY, Lin JK (1998) Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol* **177**: 324-333

Cho S, Miyashita K, Miyazawa T, Fujimoto K, Kaneda K (1987) Autooxidation of ethyl eicosapentaenoate and docosahexaenoate. *J Am Oil Chem Soc* **64**: 876-879

Comba A, Lin YH, Eynard AR, Valentich MA, Fernandez-Zapico ME, Pasqualini ME (2011) Basic aspects of tumor cell fatty acid-regulated signaling and transcription factors. *Cancer Metastasis Rev* **30**: 325-342

Courtney ED, Matthews S, Finlayson C, Di Pierro D, Belluzzi A, Roda E, Kang JY, Leicester RJ (2007) Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces crypt cell proliferation and increases apoptosis in normal colonic mucosa in subjects with a history of colorectal adenomas. *Int J Colorectal Dis* **22**: 765-776

- Crnkovic S, Riederer M, Lechleitner M, Hallstrom S, Malli R, Graier WF, Lindenmann J, Popper H, Olschewski H, Olschewski A, Frank S (2012) Docosahexaenoic acid-induced unfolded protein response, cell cycle arrest, and apoptosis in vascular smooth muscle cells are triggered by Ca(2)(+)-dependent induction of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **52**: 1786-1795
- Cui X, Kobayashi Y, Hayakawa T, Hirano S (2004) Arsenic speciation in bile and urine following oral and intravenous exposure to inorganic and organic arsenics in rats. *Toxicol Sci* **82**: 478-487
- Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y (1999) Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* **93**: 268-277
- Danbara N, Yuri T, Tsujita-Kyutoku M, Sato M, Senzaki H, Takada H, Hada T, Miyazawa T, Okazaki K, Tsubura A (2004) Conjugated docosahexaenoic acid is a potent inducer of cell cycle arrest and apoptosis and inhibits growth of colo 201 human colon cancer cells. *Nutr Cancer* **50**: 71-79
- de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjovall J, Perlmann T (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* **290**: 2140-2144
- Dong Y, Zhang M, Liang B, Xie Z, Zhao Z, Asfa S, Choi HC, Zou MH (2010) Reduction of AMP-activated protein kinase alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation* **121**: 792-803
- Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A (2013) The eIF2alpha kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci*
- Du K, Herzig S, Kulkarni RN, Montminy M (2003) TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* **300**: 1574-1577
- Duggan SP, Behan FM, Kirca M, Smith S, Reynolds JV, Long A, Kelleher D (2010) An integrative genomic approach in oesophageal cells identifies TRB3 as a bile acid responsive gene, downregulated in Barrett's oesophagus, which regulates NF-kappaB activation and cytokine levels. *Carcinogenesis* **31**: 936-945
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**: 495-516
- Espada CE, Berra MA, Martinez MJ, Eynard AR, Pasqualini ME (2007) Effect of Chia oil (*Salvia Hispanica*) rich in omega-3 fatty acids on the eicosanoid release, apoptosis and T-lymphocyte tumor infiltration in a murine mammary gland adenocarcinoma. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**: 21-28
- Fang N, Zhang W, Xu S, Lin H, Wang Z, Liu H, Fang Q, Li C, Peng L, Lou J (2014) TRIB3 alters endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis via the NF-kappaB pathway. *Metabolism* **63**: 822-830
- Fesik SW (2005) Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* **5**: 876-885
- Fradet V, Cheng I, Casey G, Witte JS (2009) Dietary omega-3 fatty acids, cyclooxygenase-2 genetic variation, and aggressive prostate cancer risk. *Clin Cancer Res* **15**: 2559-2566
- Gani OA, Sylte I (2008) Molecular recognition of docosahexaenoic acid by peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid-X receptor alpha. *J Mol Graph Model* **27**: 217-224

- Garrington TP, Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**: 211-218
- Grosshans J, Wieschaus E (2000) A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* **101**: 523-531
- Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N (2005) Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem* **280**: 32081-32089
- Hai T, Curran T (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3720-3724
- Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* **273**: 1-11
- Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, Yuan CL, Krokowski D, Wang S, Hatzoglou M, Kilberg MS, Sartor MA, Kaufman RJ (2013) ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol*
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 251-262
- Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R, Stojdl DF, Bell JC, Hettmann T, Leiden JM, Ron D (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* **11**: 619-633
- He L, Simmen FA, Mehendale HM, Ronis MJ, Badger TM (2006) Chronic ethanol intake impairs insulin signaling in rats by disrupting Akt association with the cell membrane. Role of TRB3 in inhibition of Akt/protein kinase B activation. *J Biol Chem* **281**: 11126-11134
- Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E (2007) Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal* **19**: 238-250
- Hossain Z, Hosokawa M, Takahashi K (2009) Growth inhibition and induction of apoptosis of colon cancer cell lines by applying marine phospholipid. *Nutr Cancer* **61**: 123-130
- Hsueh YM, Cheng GS, Wu MM, Yu HS, Kuo TL, Chen CJ (1995) Multiple risk factors associated with arsenic-induced skin cancer: effects of chronic liver disease and malnutritional status. *Br J Cancer* **71**: 109-114
- Humphrey RK, Ray A, Gonuguntla S, Hao E, Jhala US (2014) Loss of TRB3 alters dynamics of MLK3-JNK signaling and inhibits cytokine-activated pancreatic beta cell death. *J Biol Chem* **289**: 29994-30004
- Izrailit J, Berman HK, Datti A, Wrana JL, Reedijk M (2013) High throughput kinase inhibitor screens reveal TRB3 and MAPK-ERK/TGFbeta pathways as fundamental Notch regulators in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1714-1719
- Jakobsen CH, Storvold GL, Bremseth H, Follestad T, Sand K, Mack M, Olsen KS, Lundemo AG, Iversen JG, Krokan HE, Schonberg SA (2008) DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J Lipid Res* **49**: 2089-2100

- Jennings P, Limonciel A, Felice L, Leonard MO (2013) An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult. *Arch Toxicol* **87**: 49-72
- Jousse C, Deval C, Maurin AC, Parry L, Cherasse Y, Chaveroux C, Lefloch R, Lenormand P, Bruhat A, Fafournoux P (2007) TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *J Biol Chem* **282**: 15851-15861
- Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM (1992) Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4820-4824
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM (2002) The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 411-421
- Kaufmann WK, Paules RS (1996) DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J* **10**: 238-247
- Kim I, Xu W, Reed JC (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 1013-1030
- Kim Y, Jeong IG, You D, Song SH, Suh N, Jang SW, Kim S, Hwang JJ, Kim CS (2014) Sodium meta-arsenite induces reactive oxygen species-dependent apoptosis, necrosis, and autophagy in both androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells. *Anticancer Drugs* **25**: 53-62
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill L A, Qwarnstrom EE, Dower SK (2004) Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* **279**: 42703-42708
- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH, Michaelsen KF (2001) The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res* **40**: 1-94
- Li D, Morimoto K, Takeshita T, Lu Y (2001) Arsenic induces DNA damage via reactive oxygen species in human cells. *Environ Health Prev Med* **6**: 27-32
- Li JH, Rossman TG (1989) Mechanism of comutagenesis of sodium arsenite with n-methyl-n-nitrosourea. *Biol Trace Elem Res* **21**: 373-381
- Liang G, Hai T (1997) Characterization of human activating transcription factor 4, a transcriptional activator that interacts with multiple domains of cAMP-responsive element-binding protein (CREB)-binding protein. *J Biol Chem* **272**: 24088-24095
- Lohan F, Keeshan K (2013) The functionally diverse roles of tribbles. *Biochem Soc Trans* **41**: 1096-1100
- Lu TH, Su CC, Chen YW, Yang CY, Wu CC, Hung DZ, Chen CH, Cheng PW, Liu SH, Huang CF (2011) Arsenic induces pancreatic beta-cell apoptosis via the oxidative stress-regulated mitochondria-dependent and endoplasmic reticulum stress-triggered signaling pathways. *Toxicol Lett* **201**: 15-26
- Marnett LJ (1999) Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* **424**: 83-95
- Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rorth P (2000) Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* **101**: 511-522
- Mayumi-Matsuda K, Kojima S, Suzuki H, Sakata T (1999) Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **258**: 260-264

- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* **21**: 1249-1259
- McNeely SC, Belshoff AC, Taylor BF, Fan TW, McCabe MJ, Jr., Pinhas AR, States JC (2008) Sensitivity to sodium arsenite in human melanoma cells depends upon susceptibility to arsenite-induced mitotic arrest. *Toxicol Appl Pharmacol* **229**: 252-261
- Merendino N, Loppi B, D'Aquino M, Molinari R, Pessina G, Romano C, Velotti F (2005) Docosahexaenoic acid induces apoptosis in the human PaCa-44 pancreatic cancer cell line by active reduced glutathione extrusion and lipid peroxidation. *Nutr Cancer* **52**: 225-233
- Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Baracos VE, Reiman T, Mazurak VC (2011) Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* **117**: 3774-3780
- Narayanan BA, Narayanan NK, Reddy BS (2001) Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **19**: 1255-1262
- Nordstrom DK (2002) Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* **296**: 2143-2145
- Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D (2001) Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* **153**: 1011-1022
- Ohoka N, Hattori T, Kitagawa M, Onozaki K, Hayashi H (2007) Critical and functional regulation of CHOP (C/EBP homologous protein) through the N-terminal portion. *J Biol Chem* **282**: 35687-35694
- Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H (2005) TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J* **24**: 1243-1255
- Okamoto H, Latres E, Liu R, Thabet K, Murphy A, Valenzeula D, Yancopoulos GD, Stitt TN, Glass DJ, Sleeman MW (2007) Genetic deletion of Trb3, the mammalian Drosophila tribbles homolog, displays normal hepatic insulin signaling and glucose homeostasis. *Diabetes* **56**: 1350-1356
- Ord D, Meerits K, Ord T (2007) TRB3 protects cells against the growth inhibitory and cytotoxic effect of ATF4. *Exp Cell Res* **313**: 3556-3567
- Ord D, Ord T (2003) Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity. *Exp Cell Res* **286**: 308-320
- Ord D, Ord T (2005) Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochem Biophys Res Commun* **330**: 210-218
- Pahl HL (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6853-6866
- Park WH, Seol JG, Kim ES, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, Kim BK, Lee YY (2000) Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis. *Cancer Res* **60**: 3065-3071
- Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem N, Jr. (2001) Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. *J Lipid Res* **42**: 1257-1265

- Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349
- Ruiz-Ramos R, Lopez-Carrillo L, Rios-Perez AD, De Vizcaya-Ruiz A, Cebrian ME (2009) Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *Mutat Res* **674**: 109-115
- Sakai S, Ohoka N, Onozaki K, Kitagawa M, Nakanishi M, Hayashi H (2010) Dual mode of regulation of cell division cycle 25 A protein by TRB3. *Biol Pharm Bull* **33**: 1112-1116
- Samikkannu T, Chen CH, Yih LH, Wang AS, Lin SY, Chen TC, Jan KY (2003) Reactive oxygen species are involved in arsenic trioxide inhibition of pyruvate dehydrogenase activity. *Chem Res Toxicol* **16**: 409-414
- Samuel S, Kathirvel R, Jayavelu T, Chinnakkannu P (2005) Protein oxidative damage in arsenic induced rat brain: influence of DL-alpha-lipoic acid. *Toxicol Lett* **155**: 27-34
- Santra A, Chowdhury A, Ghatak S, Biswas A, Dhali GK (2007) Arsenic induces apoptosis in mouse liver is mitochondria dependent and is abrogated by N-acetylcysteine. *Toxicol Appl Pharmacol* **220**: 146-155
- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R (2007) DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *Journal of Zhejiang University Science B* **8**: 377-397
- Schuliga M, Chouchane S, Snow ET (2002) Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic. *Toxicol Sci* **70**: 183-192
- Seher TC, Leptin M (2000) Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during Drosophila gastrulation. *Curr Biol* **10**: 623-629
- Selim E, Frkanec JT, Cunard R (2007) Fibrates upregulate TRB3 in lymphocytes independent of PPAR alpha by augmenting CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP beta) expression. *Mol Immunol* **44**: 1218-1229
- Seol JG, Park WH, Kim ES, Jung CW, Hyun JM, Lee YY, Kim BK (2001) Potential role of caspase-3 and -9 in arsenic trioxide-mediated apoptosis in PCI-1 head and neck cancer cells. *Int J Oncol* **18**: 249-255
- Siddiqui RA, Harvey K, Stillwell W (2008) Anticancer properties of oxidation products of docosahexaenoic acid. *Chem Phys Lipids* **153**: 47-56
- Singh S, Khan AR, Gupta AK (2012) Role of glutathione in cancer pathophysiology and therapeutic interventions. *J Exp Ther Oncol* **9**: 303-316
- Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, Warrell RP, Jr. (1998) Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* **339**: 1341-1348
- Spuches AM, Kruszyna HG, Rich AM, Wilcox DE (2005) Thermodynamics of the As(III)-thiol interaction: arsenite and monomethylarsenite complexes with glutathione, dihydrolipoic acid, and other thiol ligands. *Inorg Chem* **44**: 2964-2972

- Stein SC, Woods A, Jones NA, Davison MD, Carling D (2000) The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem J* **345 Pt 3**: 437-443
- Szatrowski TP, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* **51**: 794-798
- Thiebaut AC, Chajes V, Gerber M, Boutron-Ruault MC, Joulin V, Lenoir G, Berrino F, Riboli E, Benichou J, Clavel-Chapelon F (2009) Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int J Cancer* **124**: 924-931
- Tseng WP (1989) Blackfoot disease in Taiwan: a 30-year follow-up study. *Angiology* **40**: 547-558
- Vara D, Salazar M, Olea-Herrero N, Guzman M, Velasco G, Diaz-Laviada I (2011) Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ* **18**: 1099-1111
- Wang H, Xi S, Xu Y, Wang F, Zheng Y, Li B, Li X, Zheng Q, Sun G (2013) Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction. *Toxicol In Vitro* **27**: 1043-1048
- Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Bouchier-Hayes D (1996) Mechanisms involved in sodium arsenite-induced apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* **60**: 625-632
- Weng CY, Chiou SY, Wang L, Kou MC, Wang YJ, Wu MJ (2014) Arsenic trioxide induces unfolded protein response in vascular endothelial cells. *Arch Toxicol* **88**: 213-226
- Wolk A, Larsson SC, Johansson JE, Ekman P (2006) Long-term fatty fish consumption and renal cell carcinoma incidence in women. *JAMA* **296**: 1371-1376
- Wu M, Xu LG, Zhai Z, Shu HB (2003) SINK is a p65-interacting negative regulator of NF-kappaB-dependent transcription. *J Biol Chem* **278**: 27072-27079
- Yadav S, Shi Y, Wang F, Wang H (2010) Arsenite induces apoptosis in human mesenchymal stem cells by altering Bcl-2 family proteins and by activating intrinsic pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* **244**: 263-272
- Yamagami T, Porada CD, Pardini RS, Zanjani ED, Almeida-Porada G (2009) Docosahexaenoic acid induces dose dependent cell death in an early undifferentiated subtype of acute myeloid leukemia cell line. *Cancer biology & therapy* **8**: 331-337
- Yamaguchi H, Wang HG (2004) CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**: 45495-45502
- Yen YP, Tsai KS, Chen YW, Huang CF, Yang RS, Liu SH (2012) Arsenic induces apoptosis in myoblasts through a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction pathway. *Arch Toxicol* **86**: 923-933
- Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, Yang FF, Wu ZY, Sun HB, Liang WX, Song AX, Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Zhang QY, Yang HY, Huang QH, Zhou GB, Tong JH, Zhang Y, Wu JH, Hu HY, de The H, Chen SJ, Chen Z (2010) Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science* **328**: 240-243
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12**: 982-995

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

www.Ensembl.org

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Tuuliki Biene (sünnikuupäev: 03.08.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Pseudokinaasi Trib3 roll rakkude vastuses dokosaheksaeenhappe või arseniidi poolt põhjustatud stressile”,

mille juhendajad on Tiit Örd ja Tõnis Örd ,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **26.05.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015