

Ekstrakt Maitake gljiva (D frakcija) prouzrokuje apoptozu ćelija raka dojke aktivacijom *BAK-1* gena

Raquel Soares, Manuela Meireles,¹ Ana Rocha,¹ Ana Pirraco,¹ Diego Obiol,² Eliana Alonso, Gisela Joos,² and Gabriela Balogh²

¹Odsjek za biohemiju, Medicinski fakultet, Universitet Porto Foundation, Porto, Portugal.

²Centar za naučna i tehnička ispitivanja, Cerzos-Conicet, Bahía Blanca, Argentina.

ABSTRAKT Gljive su se godinama empirijski koristile kako bi se liječile mnoge bolesti. Studija maitake gljiva koje imaju imunomodulacijske i antitumorne osobnosti je dovela do izolacije nekoliko bioaktivnih sastojaka. Poznato je da jedan od ovih sastojaka – D frakcija, značajno smanjuje održivost ćelija tumora. Studija je ispitala učinak izolirane D frakcije na održivost i apoptozu ćelija ljudskog raka dojke (MCF 7). Te ćelije su tretirane sa ekstraktom maitake gljiva (D frakcija) od 18µg/mL, 36µg/mL, 91µg/mL, 183µg/mL ili 367µg/mL ili se nisu tretirale (kontrolni uzorci) u trajanju od 24 sata. Inkubacija MCF7 ćelija sa ekstraktom maitake je rezultirala u smanjenoj održivosti ćelija [analiza 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolijum] dozno zavisne primjene. Apoptoza se statistički značajno povećavala u smilu dozne zavisnosti na svakoj testiranoj koncentraciji (analiza terminalne deoksinukleotidil transferaza-posredovani deoksiuridin trifosfat nick-end označavanja). Nakon inkubacije sa D frakcijom, analiza mikronizova je otkrila prilagodbu naviše transkripta *BAK-1* i citokroma, 2 proteina direktno povezana putem apoptoze. Studije reakcije povratnog transkriptaznog polimeraznog niza su potvrdile ove rezultate, *BAK-1* je bio jedan od najizraženijih gena, kako se moglo vidjeti u analizi mikronizova. Ti rezultati su potvrdili apoptozni učinak D frakcije maitake gljiva na ćelije raka dojke i izrazile su prisustvo ispuštanja citokroma c u citoplazmu. Citoplazmično ispuštanje citokroma c, još jednog od sudionika u putu apoptoze, se povećalo nakon inkubacije sa frakcijom D u dozno ovisnom maniru. Ti rezultati su indicirali da učinak ovih sastojaka podrazumijeva mitohondričnu disfunkciju. Identifikacija molekularnih mehanizama kojima D frakcija ispoljava svoj učinak je od krajnje važnosti za razvoj preventivnih i terapijskih strategija u borbi protiv raka.

KLJUČNE RIJEČI: • apoptoza • *BAK-1* • rak dojke • citokrom c • maitake • gljiva

UVOD

RAK DOJKE je vodeći uzrok smrti od raka kod žena, najčešći je tip raka od kojeg žene mogu oboljeti u cijelom svijetu, i drugi najčešći oblik raka u svijetu. Javljanje ovog raka je još uvijek u porastu, sa 1,050,100 slučajeva u 2002. godini u poređenju sa 572,100 1980. godine. Rak dojke uzrokuje 370,000 smrti godišnje, što predstavlja 13.9% svih smrti prouzrokovanih rakom kod žena, većinom u industrijskim zemljama.¹ Dok istraživači traže uzrok te bolesti, učinkoviti i brzi tretman liječenja je neophodan za pacijente.

Maitake gljiva (*Grifola frondosa*) je dinovska gljiva autohtona za sjeverni dio Japana i japanski travari je koriste već duži niz godina. Većina istraživanja maitake gljiva se fokusirala na korištenje D frakcije maitake gljive za liječenje raznih zloćudnih bolesti.

Bioaktivna D frakcija dobivena iz maitake je proteinski vezani polisaharinski spoj i priprema se standardiziranim postupkom koji je razvila kompanija Maitake Products Inc. Nakon što su se razne frakcije maitake pripremile, pokazalo se da je D frakcija najjača u povećanju imunog sistema kroz oralnu primjenu ili injekciju (oba načina su bila učinkovita), što je dovelo do najveće redukcije proliferacije raka.² Pokazalo se da je D frakcija maitake gljiva ispoljila antitumorni učinak na miševu koji boluju od tumora tako što je pojačala imuni sistem kroz aktivaciju makrofaga, T ćelija i prirodnih ćelija ubica.³ U prethodnoj studiji, kombinacija imunoterapije sa maitake D frakcijom i kemoterapijom je pokazala da D frakcija može smanjiti veličinu raka pluća, jetre i dojke kod pacijenata koji boluju od raka.^{2,4,5} 1988. godine, Agencija za hranu i lijekove je dala dozvolu Maitake Product, Inc., koji su aplicirali za istraživanje novog lijeka, pilotnu studiju faze II u kojoj su koristili D frakciju maitake gljive kod pacijenata sa uznapredovalim stadijima raka dojke i prostate. Te studije koje još uvijek traju evaluiraju imuni stimulatorni efekat D frakcije na veličinu tumora, analize imuniteta, kliničke simptome i kvalitetu života pacijenata.

Manuskript zaprimljen 7. aprila 2010.godine Revizija zaprimljena 23. septembra 2010.godine

Adresa za korespondenciju: Dr. Gabriela A. Balogh, Cerzos-Conicet, Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca, Camino La Carrindanga Km 7, Bahía Blanca 8000, Argentina, E-mail: gbalogh@criba.edu.ar

Svrha date studije jeste istraživanje direktnog učinka frakcije D maitake gljiva na MCF7 ćelije raka dojke. Otkrili smo da je inkubiranje ćelija MCF7 sa D frakcijom maitake gljiva značajno smanjilo održivost ćelija i dovelo do smrti ćelija. Genomska analiza korištenjem komplementarnih DNK (cDNK) mikronizova je otkrila prilagodbu naviše 22-pro-apoptoičnih i 7 anti-apoptoičnih gena u poređenju sa neliječenim MCF7 ćelijama (kontrolnim). Neregulisan je bio transcript *BAK-1* na vjesni RNK nivo. Nakon inkubacije sa D frakcijom, citoplazmičko ispuštanje citokroma c, još jednog od sudionika u putu apoptoze, se povećao u dozno ovisnom maniru.

MATERIJALI I METODE

Bioaktivna D frakcija maitake gljiva

Bioaktivna D frakcija se dobila iz maitake gljiva, i korespondirala je proteinski vezanom polisaharidnom spoju, te je pripremljena korištenjem standardizirane procedure koju je razvila kompanija Maitake Products, Inc.

Kulture ćelija

Ćelije ljudskog raka dojke MCF7 su dobivene od American Type Culture Collection kompanije. MCF7 ćelije su se rutinski kultivirale u Eagle minimalnom esencijalnom materijalu koji je sadržavao 10% inaktivnog fetalnog govedeg seruma i 1% penicilina/streptomycin koji je kupljen od Invitrogen Life Technologies. Ćelije su uzgajane na 37°C na vlažnosti zraka od 5% u CO₂ atmosferi. Sukladno sa pretnodnim studijama, inkubacija se vršila 24 sata u stanjima bez seruma.⁶

Označavanje i cDNK ljudski mikronizovi

Preuzeli smo direktno označavanje sonde sa amino-modificiranim randomiziranim fitiljem, koristeći 5µg amplicirane RNK (aaRNK) kao početni materijal. 5 µg aaRNA (8 µL) je kombinirano sa amino-modificiranim randomiziranim fitiljem (2 µg/mL, 1 µL) i ribonukleinskim inhibitorom (5 jedinica/µL, 1 µL). Mješavina je inkubirana na 70°C u trajanju od 10 minuta i onda hlađena na ledu 10 minuta. Fitoljni RNK rastvor je dodan povratnom transkriptivnoj mješavini (5x pufer prvog niza; 50 x amplifikirani deoksiuridin trifosfat [dUTP]/dinukleotid trifosfat [25 mM deoksidenozin trifosfat, deoksiguanozin trifosfat, i deoksicitidin trifosfat; 15 mM deoksitimidin trifosfat; i 10mM aminoalil dUTP], 0.6 µL; ditiotreititol, 0.1 M, 3µL; superskript II reverzibilne transkriptaza [Invitrogen/Life Technologies], 2µL), i inkubirana na 42°C u trajanju od 2 sata. Reakcija je prekinuta dodavanjem EDTA (0.5 M, 10 µL), i RNK se hidrolizirao sa NAOH (1 M, 10µL) na 65°C u trajanju od 30 minuta.

Purifikacija sonde

Sonde su se čistile sa QIA brzom reakcijom polimeraznog niza (PCR) opremom čišćenja (Qiagen); Cy3- i Cy5-označeni proizvodi su kombinovani i 30µL vode je dodano, i također 500µL Buffer PB. Uzorci su se dodali u QIA brze kolone, koje su centrifugirane na 13,000 opm u trajanju od 1 minute, nakon čega se njihov niz odstranio. Kako bi se kolone oprale, 750µL Buffer PM je dodano, kolone su se ponovo vrtile 1 minut, i niz se odstranio. Postupak pranja se ponovio još jednom, i kolone su se vrtile da se otkloni preostali etanol. Svježe tube za skupljanje su postavljene ispod svake kolone, 30µL Buffer EB je dodano, i tube su inkubirane 1 minutu na sobnoj temperaturi. Kolone su se centrifugirale na 13,000 opm u trajanju od jedne minute i postupak elucije se ponovio još jednom. Eluti su djelomično osušteni u vakumskoj centrifuge i zapremina se prilagodila na 23µL sa vodom.

Hibridizacija i uslovi pranja

Dodani su sljedeći: 4.5 µL 20x slanog sodijum citrata, 2 µL poli (A) (10 mg/mL) i 0.6 µL 10% (wt/vol) sodijum dedocil sulfata (SDS). Sonde su denaturisane na 98°C u trajanju od 3 minute. Produkti su pipetom preneseni na nizove, preklopne pločice su dodane, i slajdovi su stavljeni u hibridizacijsku posudu (Corning). cDNK mikronizovi koje sadrže 25,000 poznatih

gena su inkubirani na 45°C u vodenom kupatilu u trajanju od 16 sati i naknadno su oprani sa 0.5x slanim solijum citratom, 0.01% (wt/vol) SDS, nakon toga sa 0.06x SSC, na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta za svaki. Slajdovi su se vrtili 5 minuta na 800 opm (130g) na sobnoj temperaturi.

Skeniranje i analiza nizova

Nizovi su se čitali uz pomoć Affymetrix 428 florescentnog skenera (MWG Technologies) na 10- µm rezoluciji i varijabilnim podešavanjima napona fotoumnoživačkih tuba kako bi se dobio maksimalni intenzitet signal sa manje od 1% (wt/vol) zasićenja probe. Rezultirajuće slike su analizirane uz pomoć ImaGene, verzije 4.2, i softvera GeneSight, verzije 4.0 (Biodiscovery, Inc.). Nakon normalizacije Lowess, podaci su analizirani korištenjem GeneSight 4.0 softvera (Biodiscovery).

Hijerarhijska analiza nakupina

Hijerarhijsko nakupljanje se postiglo korištenjem metode spajanja susjeda koja se primjenila na matricu Pearson korelacijske daljine. Dodano, druge metode hijerarhijske nakupine i druge funkcije generiranja razdaljine (kao što je Eukledianova) su korištene. Samo marginalne devijacije između metoda i matrica razdaljine su se posmatrale. Otkrili smo da je najstabilniji rezultati za metodu spajanja susjeda primjenjeni na matricu Pearson korelacijske daljine.

Analiza MTS toksičnosti

MCF7 ćelijama (2x10⁵ ćelija/mL) je dozvoljeno da rastu do 70-90% presjeka i inkubirane su uz svaki tretman na 24 sata. Ćelije su se prale dva puta otopinom fosfat-pufera, i njihova vidljivost je procjenjena korištenjem Cell Titer 96 Aqueous ONE Solution Reagent (MTS [3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolijum] klorometričke analize (Promega), uz korištenje uputstava proizvođača. Optička gustina se mjerila na 492 nm. Rezultati su izraženi kao procenti kontrole, koja se uzela na 100%.

TUNEL analiza

Ćelije uzgajane do 70% presjeka na staklenim pločicama za preklapanje su inkubirane uz različite tretmane na 24 sata. TUNEL analiza (terminalne deoksinukleotidil transferaza-posredovani deoksiuridin trifosfat nick-end označavanja) su se izvršila korištenjem In Situ opreme za ubijanje ćelija (Roche Diagnostics), slijedeći uputstva proizvođača. Jezgre su protivno-obojene sa 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche Diagnostics). Procenat TUNEL obojenih jezgri se procjenio u odnosu na svako DAPI-obojeno jezgro koje se posmatralo. Imunoflorescencija se posmatrala na florescentnom mikroskopu (Olympus, BH-2). Procenat obojenih ćelija se procjenio brojanjem ćelija obojenih sa TUNEL podijeljenih sa ukupnim brojem ćelija obojenih sa DAPI na 200 x povećanom polju. Hiljadu jezgri se procjenilo i izvela su se tri nezavisna eksperimenta.

Povratna transkriptaza PCRa

Povratna transkriptaza (RT) PCRa se izvodila kako bi se potvrdili rezultati dobiveni cDNK analizom hibridizacije MCF7 ćelijskih lizola. Za svaki uzorak, 1.0µg RNK se povratno transkribovalo u reakcijskoj zapremini 25 µL u prisustvu 10mM dNTP i 2µL RT-PCR mješavine enzima. Gensko posebni fitilji za *BAK-1* (unaprijed: GAGAGCC TGCCCTGCCCTCT; obratno: CCACCCAGCCACCCCT CTGT), su koamplificirani sa setom fitilja za održavajući gen *βActin* i koristili su se za reakciju RT-PCR. Kvantificiranje se radilo trostruko. PCR produkti su razdvojeni na etidium bromid-obojenom 2% agaroznom gelu. Intenzitet florescencije se automatski mjerio i integrisao koristeći softver Genescan (Image Master, Pharmacia).

Western naticanje

Proteini su izolirani iz ukupnih ćelijskih lizola MCF7 korištenjem Tripure (Roche Diagnostics). Za izolaciju citoplazmičnih proteina, kulture ćelija MCF7 su podvrgnute Abcam protokolu ćelijske frakture (Tufts-New England Medical Center and Molecular Cardiology Research Center). Skraćeno, ćelije su rastvorene sa 500 μ L finalnog rastvora ćelijske frakture i držane na ledu 20 minuta. Proteinska citoplazmična frakcija se dobila centrifugiranjem na 8000 opm u trajanju od 10 minuta. Kuglice su oprane i proteini su kvantificirani korištenjem opreme za kvantifikacijsku analizu sa bicinkroničnim kiselinskim proteinima (Pierce Biotechnology). Jednake količine proteina su podvrgnute 100% SDS-poliakramidnoj gelskoj elektroforezi sa 5% gelom za slaganje. Nakon elektroforeze, protein su nicali na membrane Hybond nitroceluloze (Amersham Biosciences) korištenjem elektroforetični transfer ćelija sa mini-prenosnim naticanjem (Amersham Biosciences). Imunodetekcija citokroma c i baktina (oba na rastvoru od 1:2000) (Santa Cruz Biotechnology) je postignuta povećanim hemijskim osvjetljavanjem (ECL oprema, Amersham Biosciences). Anti-kozije sekundarno antitijelo konjugirano sa hrenovom peroksidazom (1:5000) je dobiveno od Santa Cruz Biotechnology kompanije. Analiza relativno intenziteta naticanja svakog proteina se mjerila korištenjem kompjuterskog softvera (Biorad) i normalizovana sa baktin trakama kako bi se poredio izražaj proteina u različitim tretmanskim grupama. Eksperiment se ponovio 3 puta.

Statistička analiza

Svi eksperimenti su se ponavljali tri puta. Kvantifikacije su izražene kroz značajke \pm standardnih devijacija. Uzorci su procjenjeni analizama raznih testova. Razlike između posmatranih grupa su se analizirale uz pomoć Student *t*-testa i smatrale su se statistički značajnim kada je *P* vrijednosti bila manja od .05. Statistička analiza se vršila uz pomoć GraphPad programa.

REZULTATI

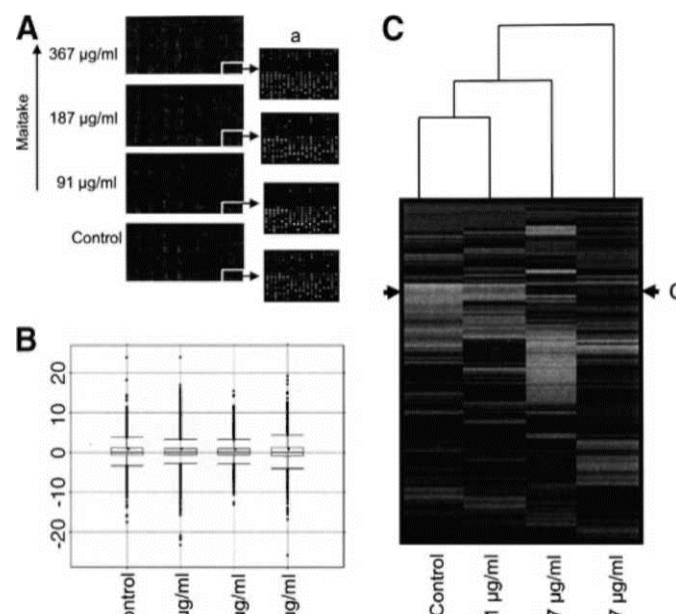
Maitake povećava izražavanje apoptoznih gena u ćelijama raka dojke

Naš cilj je bio da odredimo da li frakcija D iz *G frondosa* može uzrokovati put apoptoze u ćelijama MCF7. Izvršili smo cDNK mikroanalize koristeći 25,000 poznatih ljudskih gena. MCF7 ćelije su tretirane sa povećanim koncentracijama D frakcija preko 24 sata. Slika 1A pokazuje reprezentativnu cDNK sliku mikroanalize svake od MCF7 ćelija tretiranih sa ili bez povećane koncentracije maitake D frakcije. U gornjem dijelu Slike 1A, "a" odgovara kockastoj sekciji naznačenoj na slici mikroanalize. Urađena su tri neovisna eksperimenta. Slika 1B predstavlja analizu box plot nakon Lowess normalizacije pod svim uvjetima.

Geni čiji su se izražaji promijenili su smatrani za statistički značajne prema ustanovljenim algoritmima, i geni čiji se izražaj promijenio najmanje dvostruko kao rezultat liječenja maitake gljivama su uzeti za daljnje analize. Ovaj kombinovani analitički metod je imenovao različito izražene gene sa velikom osjetljivosti i posebnosti.

Identificirali smo 4321 genske sekvence koje su bile različito izražene (*t*-testom uz lažni procenat otkrića, $P < .05$) nakon inkubacije sa D frakcijom (na 91 μ g/mL ili 187 μ g/mL ili 367 μ g/mL kroz 24 sata) na ćelijama MCF7. Hijerarhijsko nakupljanje koje nije bilo nadgledano je izvršeno korištenjem izražajnih profila 4321 globalno varirajućih gena kroz kontrole i ćelije MCF7 koje su primale maitake gljive (setovi podataka predstavljaju četiri grupe) su otkrile da su se uzorci nakupljali prvenstveno na osnovnu tretmana D frakcijom. Slika 1C predstavlja nenadgledano hijerarhijsko nakupljanje 3 u svim stanjima. Ti rezultati govore da je osnovni izvor globalnih varijacija izražaja gena u ovim setovima podataka bio zbog koncentracije Maitake. Na slici 1C, crne strijelice ukazuju na

specifične varijacije u izražaju gena vezano za apoptozu zbog tretmana Maitake gljivama.



SLIKA. 1. Analiza izražaja gena prouzrokovana maitake gljivama u ćelijama raka dojke MCF7. (A) Slike cDNK mikroanalize koristeći 25,000 poznatih gena iz MCF7 liječenih sa ili bez (kontrolni) povećanih koncentracija maitake D frakcije. Povećane slike s desne strane (a) odgovaraju indikovanim bijelim kockama za svako stanje. Mikroanalize cDNK su rađene uz ljudske reference i korištena je Cy3 fluorescentna boja. U mikroanalizi, zelene tačke odgovaraju Cy3 kanalu ili ljudskoj referenci; u crvenim kanalima (Cy5 boja) sa crvenim tačkama, posmatrali smo gene koji su previše izloženi u odnosu na kontrolne i MCF7 liječene ćelije. Žute tačke ukazuju na gene koji su izraženi u oba kanala (tj. jednako su bili izraženi za ljudske reference i za uzroke). (B) Analiza box plot po Lowess normalizaciji podataka jer izvršena za svako stanje (vidjeti sekciju Materijali i metodi). (C) Matrica dvodimenzionalnog nenadgledanog hijerarhijskog nakupljanja podataka, koja sadrži 25,000 gena iz 4 uzorka i predstavlja kontrolu i maitake tretirane MCF-7 ćelije. Redovi predstavljaju gene a kolone stanja uzorka. Eksperimenti cDNK mikroanaliza su se radili tri puta. Crne stijeće (c) ukazuju na 29 gena vezanih za apoptozu koju su značajno preizraženi nakon maitake tretmana (Tabela 1).

Samo 29 apoptoznih gena su bili statistički značajno neregulirani nakon maitake tretmana (Tabela 1). *BAK-1* je bio jedan od pro-apoptoznih gena sa najviše povećanim izražajem nakon inkubacije sa D frakcijom. Shodno tome, izražaj *BAK-1* je bio nenadgledan od strane liječenja D frakcijom u dozno ovisnom maniru; izražaj se povećao skoro 25 puta nakon inkubacije sa 367 μ g/mL D frakcije u poređenu sa kontrolnim (Tabela 1). Tabela 1 navodi tih 29 gena i prosječnu vrijednost u odnosu na kontrolnu. Četiri od 29 gena su bili vezani za indukciju apoptoze (pro-apoptozni geni): *BAK-1* (BCL2-antagonist/ubica 1), *BCL2L13* (BCL2-nalik 13 [omogućuje apoptozu]), *BID* (BH3 interaktivni područni smrtni antagonist) i *NUPRI* (nuklearni protein 1). Jedan gen, citokrom c1 (*CY1*) je bio vezan za prenos elektorna iz mitohondrije; 17 su bili direktno vezani za apoptozu; i 7, uključujući *MPO* (mieloperoksidaza), *TNFAIP8* (factor nekroze tumora α -uzrokovani protein 8), *VDAC-2* (naponski ovisan anijonski kanal 2), i *BCL2L2* (BCL2-nalik 2), su bili vezani za anti-apoptozu (anti-apoptozni geni). Odlučili smo da počnemo analizirati apoptozni put sa jednim od gena kojeg je maitake najviše aktivirao u MCF7 ćelijama.

Maitake direktno prouzrokuje smrt ćelija u ćelijama raka dojke

Kako bi se odredilo da li frakcija D maitake može direktno utjecati na smrt ćelija u MCF7 ćelijama, tretirali smo ćelije sa povećanim koncentracijama maitake i procijenili održivost ćelija i smrt ćelija koristeći Time Lapse mikroskop; slikano je svakih 10 minuta u trajanju od 24 sata. Slika 2A predstavlja reprezentativnu sliku (iz 3 nezavisna eksperimenta) MCF7 ćelija kulture tretirane sa i bez maitake na različitim koncentracijama.

Dati podaci odgovaraju slikama uslikanim 1 sat, 5 sati, 10 sati i 24 sata nakon tretmana. Mikroskopse slike su podešene na povećanje od 20 puta. Nakon što smo analizirali video podatke i izbrojali relativni postotak smrti ćelija u svakom uvjetu, otkrili smo značajan porast u smrti ćelija sa dozno ovisnim tretmanom; apoptoza je bila najveća na maksimalnoj koncentraciji od 367 µg/mL, dostižući skoro 98% smrt ćelija (Slika 2B). Uvidjeli smo da je visoki postotak smrti ćelija pod svim uvjetima bio zbog napora (inkubacija na sobnoj temperaturi i kontrolisanoj nevlažnoj atmosferi) kojem su ćelije bile izložene zbog opreme Time Lapse. Atmosfera se nije kontrolisala kako bi se izmjerila vlažnost zraka.

D frakcija je smanjila održivost ćelija MCF7 i povećala apoptozu

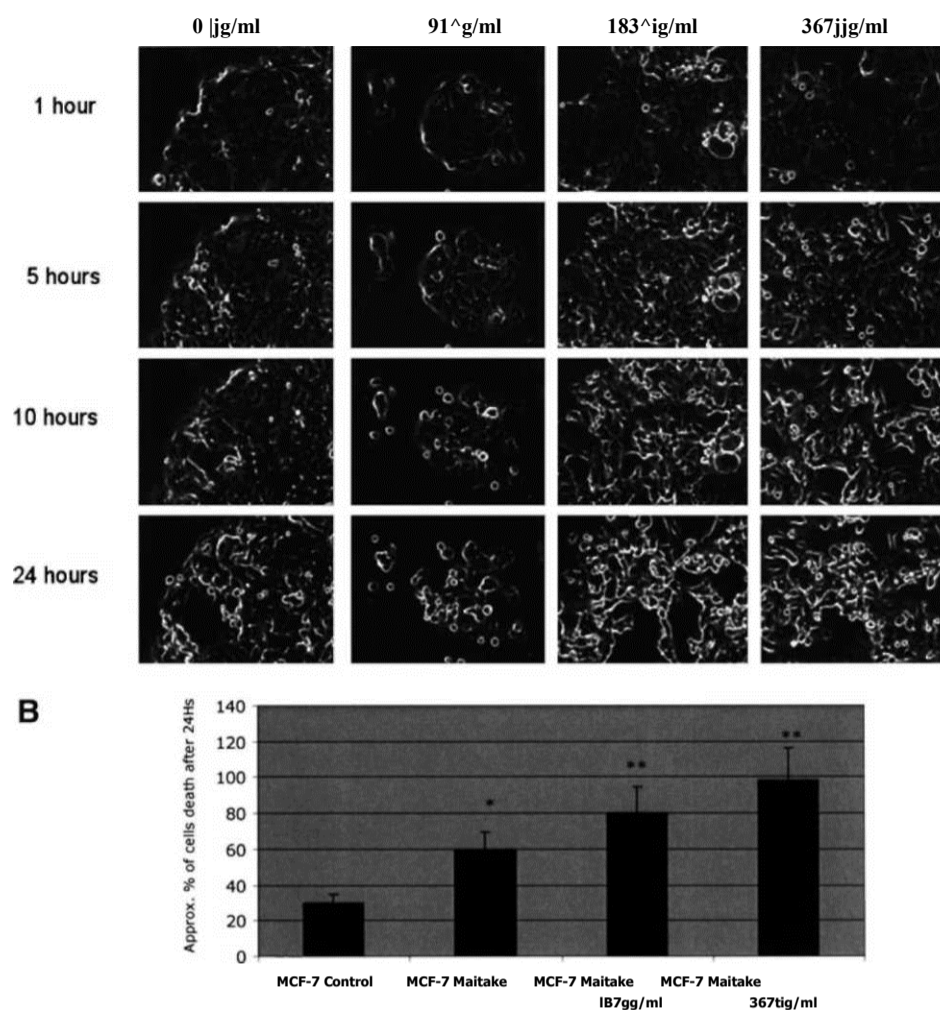
Dokazi da maitake D frakcija ima učinak protiv raka i da direktno utječe na smrt ćelija nagnala nas je da izmjerio učinak ove mješavine na održivost MCF7 ćelija i da ispitamo da li su okidači za smrt ćelija vezani za apoptozu. Održivost ćelija je prvenstveno ispitana uz pomoć analize MTS u kojoj su MCF7 ćelije inkubirane sa 5 različitih koncentracija D frakcije.

Broj održivih ćelija se značajno smanjio uz povećanje koncentracije D frakcije (Slika 3). Zapravo, najveća koncentracija D frakcije je rezultirala u značajnom smanjenju mogućnosti održivosti ćelija u poređenju sa kontrolnim vrijednostima (Slika 3).

Kako bismo procijenili da je smanjenje održivosti ćelija bilo zbog povećane apoptoze, urađena je analiza TUNEL. MCF7 ćelije (4×10^4) su inkubirane sa istih 5 koncentracija maitake D frakcije u trajanju od 24 sata, i procenat apoptoznih ćelija je kvantificiran. Liječenje tom frakcijom, u bilo kojoj koncentraciji je dovelo do statistički značajnog porasta u broju apoptoznih ćelija u dozno ovisnom načinu (Slika 3B). Skoro 95% ćelija je postalo apoptozno kada su liječeni sa najvećom koncentracijom maitake frakcije (367 µg/mL) (Slika 3B). Slika 3C pokazuje reprezentativnu sliku tih kasnijih rezultata. Kao što je posmatrano, liječenje ovom frakcijom povećava broj apoptoznih ćelija (zelenih) u poređenu sa neliječenom kulturom.

Tabela 1. Profil izražaja apoptoznih gena u MCF7 abnormalno izraženih nakon inkubacije sa D frakcijom maitake relativnom na netretirane ćelije

Gen Broj	Gen ID	Gen Symbol	Gen Broj	Biološka Funkcija	Odnos po koncentraciji D frakcije			
					367 µg/mL	183 µg/mL	92 µg/mL	37 µg/mL
1	H52673	BAK1	BCL2-antagonist/ubica 1	Indukcija apoptoze	25.022	4.526	1.234	0.417
2	W74646	BCL2L13	BCL2-like 13 (pomagač apoptoze)	Indukcija apoptoze	22.828	10.526	4.615	0.586
3	AA457705	IER3	Direktni rani odgovor 3	Apoptoza	20.131	19.520	13.957	1.163
4	AA700443	SEMA6A	Sema domena, (semaphorin) 6A	Apoptoza	19.494	16.485	1.862	0.585
5	R55303	NGFR	Receptor faktora rasta nerava	Apoptoza	16.425	8.194	6.934	0.407
6	AA927951	FXR1	Osjetljiva X mentalna retardacija	Apoptoza	12.056	6.495	3.523	0.691
7	T64469	NUPR1	Nuklearni protein 1	Indukcija apoptoze	8.750	7.620	2.030	0.693
8	AA872011	AXUD1	AXIN1 regulisan naviše 1	Apoptoza	7.659	7.363	1.368	1.330
9	R96507	ADAMTSL4	ADAMTS-sličan 4	Apoptoza	6.842	16.334	6.139	1.201
10	AA018124	HD	Huntingtin (Huntingtonova bolest)	Apoptoza	6.161	4.981	1.620	0.418
11	AA625671	DAP3	Protein povezan sa smrti 3	Apoptoza	5.949	3.590	1.159	0.421
12	AA919063	BID	BH3 domena interakcije Antagonist smrti	Indukcija apoptoze	5.941	8.429	1.125	0.362
13	AA634466	PPP1R13B	Proteinska fosfataza 1	Apoptoza	5.790	4.597	2.524	0.972
14	AA447774	CYC1	Citokrom c-1	Electron transport	5.752	8.168	3.116	0.286
15	AA777555	TNFRSF19	Receptor faktora nekroze tumora	Apoptoza	5.589	7.404	1.272	0.730
16	N70382	CCAR1	Ciklus diobe ćelija i Regulator apoptoze 1	Apoptoza	5.537	13.580	8.613	0.471
17	AA878235	UNC5D	Unc-5 homolog D (<i>C. elegans</i>)	Apoptoza	4.998	3.721	0.899	0.636
18	AA236957	ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanin nucleotid Faktor razmjene	Apoptoza	4.731	28.364	8.283	0.881
19	AA181808	APIP	APAF1 protein interakcije	Apoptoza	4.644	12.486	2.357	0.749
20	AA458464	CTNBL1	Katenin, beta-sličan 1	Apoptoza	3.526	9.187	4.688	1.406
21	AA704483	ITGB2	Integrin, beta-2	Apoptoza	2.956	5.006	2.412	0.570
22	AA044059	VDAC1	Napon-zavisni Anijonski kanal 1	Apoptoza	2.685	3.684	3.137	1.059
23	AA703058	MPO	Mieloperoksidaza	Anti-apoptoza	24.131	7.729	7.636	0.343
24	AA454588	BCL2L2	BCL2-sličan 2	Anti-apoptoza	13.216	16.176	8.567	0.353
25	AA002126	BIRC3	Bakuloviral IAP Ponovni-koji sadrži 3	Anti-apoptoza	10.558	10.239	1.838	1.152
26	H57855	TNFAIP8	Faktor nekroze tumora, α-inducirani protein 8	Anti-apoptoza	9.454	6.262	8.567	0.449
27	AA857093	VDAC2	Napon-zavisni Anijonski kanal 2	Anti-apoptoza	8.228	12.687	5.652	0.687
28	N32514	SFRP1	lučeni protein vezan za kovrčanje 1	Anti-apoptoza	7.613	7.805	2.386	0.743
29	AA703531	IL24	Interleukin 24	Anti-apoptoza	7.323	3.138	2.645	0.404



SLIKA. 2. Analiza smrti ćelija prouzrokovana maitake gljivama kod MCF7 ćelija korištenjem Time Lapse mikroskopa. MCF7 ćelije na 70% presjeku su tretirane sa ili bez (kontrolni) povećane koncentracije D frakcije maitake. Eksperimenti su izvođeni tri puta. Ćelije su stavljene pod Time Lapse mikroskop na CO₂ atmosferi na sobnoj temperaturi u trajanju od 24 sata. Kamera je podešena da slika svakih 10 minuta, koristeći x20 objektiv. Slike i videi su analizirani korištenjem posebnog softvera. **(A)** Prikazana slika odgovara kulturi ćelija 1 sat, 5 sati, 10 sati i 24 sata nakon liječenja maitake u stanjima navedeni iznad. **(B)** Približan procenat mrtvih ćelija posmatranih 24 sata nakon maitake inkubacije.

Maitake povećava izražaj gena *BAK-1* kod MCF7 ćelija

Izražaj *BAK-1* gena je značajno povišen nakon inkubacije sa D frakcijom. Shodno tome, izražaj *BAK-1* nije bio regulisan liječenjem D frakcije u dozno zavisnom načinu. Transkript *BAK-1* se ispitao koristeći analizu RT-PCR. Kako je prikazano na Slici 4, vjesni RNK nivo *BAK-1* se povećao nakon liječenja maitake D frakcijom na povećanim koncentracijama, potvrđujući prethodne rezultate dobivene analizom mikronizova. U toj analizi, održivi gen, *βActin* se koristi za kontrolu izražaja gena. Slika 4 pretstavlja odnos izražaja gena *BAK-1* u odnosu na *βActin* (gornji panel i RT-PCR-specifičnih traka u odnosu na koncentraciju maitake (donji panel).

Maitake povećava citokrome na C citoplazmičnim nivoima kod MCF7 ćelija

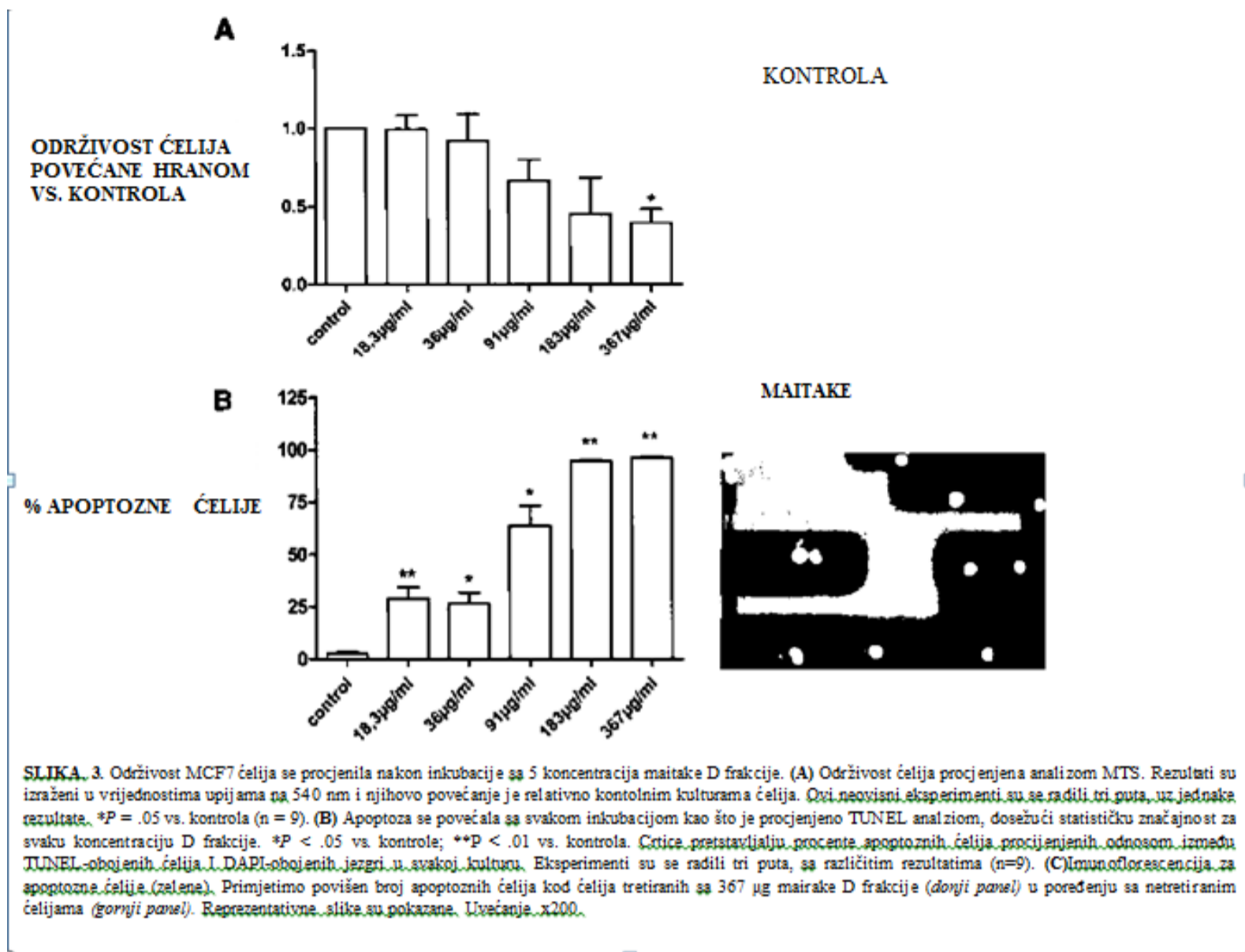
Kako bi se dalje ispitali mogući mehanizmi kojima maitake D frakcija ispoljava svoj učinak apoptoze, izražaj citokroma c se ispitao. Citoplazmični lizoli su dobiveni iz prethodno inkubiranih kultura sa 5 različitih koncentracija maitake D frakcije ili su bili ostavljeni ne tretirani u trajanju od 24 sata; izražaj citokroma c se ispitao koristeći Western naticanje. Iako nije bilo nikakvih značajnih rezultata, dozno ovisni portast se desio kod citoplazmičnog citokroma c kada se liječio mješavinom. Ti rezultati sugerisu da je D frakcija pospješila ispuštanje citokroma iz mitohondrija (Slika 5).

DISKUSIJA

Procenat smrtnosti od raka dojke je ostao skoro nepromijenjen u proteklih 50 godina. Po procentima smrtnosti, raku dojke prednjači jedino rak pluća.^{7,8} Neuspjeh da se pobjedi ova bolest leži većinom u činjenici da je bilo nemoguće otkriti posebni etiološki agent, odrediti tačno vrijeme početka i otkriti molekularne organizme odgovorne za početak i razvoj raka.

Dok se ne otkrije tačan uzrok raka dojke, istraživači rade na otkrivanju anti-tumorskih agenata i njihove moguće kliničke upotrebe. Učinkovita terapija je postala jako bitna u borbi protiv ove bolesti. Trenutni tretmani za rak dojke uključuju operacije koje slijede radijacija i hormonalne terapije ili kemoterapije. Neka od ovih liječenja imaju negativne učinke. Lijekovi koji se koriste kod kemoterapije utiču na normalne ćelije kao i na ćelije raka. Istraživači pokušavaju otkriti lijekove koje napadaju samo ćelije raka, a koje ne štete normalnim ćelijama. Jedan od mogućih pristupa jeste da se traže mješavine koje mogu blokirati gene koji su povezani sa preobrazbom normalnih ćelija u ćelije raka.

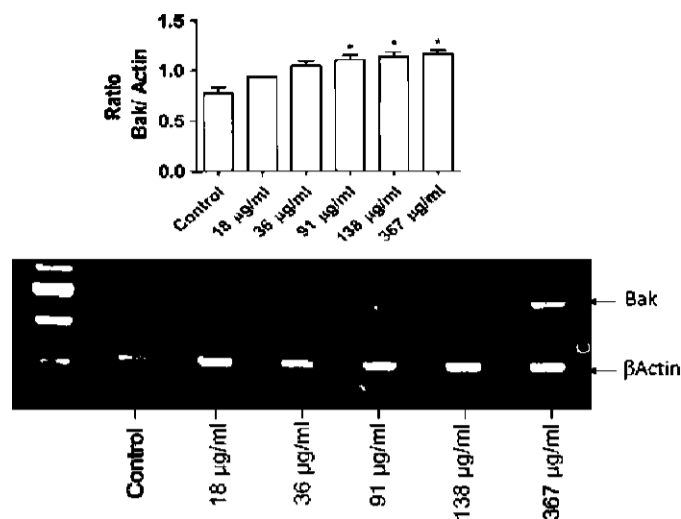
U skorije vrijeme, nekoliko in vitro studija su pokazali da pentameter (iz porodice flavonoida izvedenih iz čokolade) spriječava razvoj ćelija raka kod ljudi.^{9,10} Dodatno, hiljadama godina, ljudi su koristili medicinske gljive zbog njihovog bogatih ljekovitih svojstava.



Bogata tradicija narodne tradicije je prenijela znanje o gljivama kroz generacije, posebice u Japanu i Kini gdje se gljive godinama proučavaju i gdje one igraju veliku ulogu u kulturnoj svijesti naroda. Istraživači iz Sjedinjenih Država su proučavali te fascinante organizme zbog njihovih medicinskih svojstava. Budućnost gljiva kao suplemenata hrane se čini blistavom sve dok kliničke studije nastave da podržavaju svojstva gljiva kao snažnih ljekovitih agenata s sposobnošću da unaprijede zdravlje ljudi.

U ovoj studiji smo dokazali da D frakcija maitake gljive uzrokuje apoptozu MCF7 ćelija raka dojke. Ti rezultati su potpomognuti smanjenjem održivosti ćelija uz 5 različitih koncentracija ove frakcije. Iako nekoliko gena koji su izrazili apoptozu nisu bili regulisani, kao što je procijenjeno analizama cDNK mikronizova, studija je ispitala *BAK-1* i citokrome c unutar datih ćelija. Naši rezultati RT-PCR *BAK-1* su potvrdili povećan izražaj *BAK-1*. *BAK-1* protein se lokalizira na mitohondrijama i uzrokuje apoptozu ubrzanjem otvaranja mitohondrijskog naponski-ovisnog anijonskog kanala (VDAC), koji vodi do gubitaka u potencijalu membrane i ispuštanju citokroma c. Pro-apoptozni protein Bcl-2 porodice su uzrokovali apoptozu blokirajući anti-apoptoznu aktivnosti Bcl-2 i Bcl-xL vezanjem na svoja mjesta vezanja na mitohondrijama ili tako što su prouzrokovali aktivaciju pro-apoptoznog Bax/Bak.¹¹ Citokrom c je posrednik u apoptozi, kontrolisani oblik smrti ćelija korištenog da ubije ćelije u procesu razvoja ili reakcije na infekciju ili oštećenje DNK. Citokrom c se pušta u mitohondrije u odgovoru na pro-apoptozni stimulans.¹² Naš cilje je pronalazak tačnih molekularnih mehanizama aktivacije apoptoze koju pokreće maitake u ćelijama raka dojke.

Dokazi su pokazali da *BAK-1* pospješuje smrt ćelija i zaustavlja djelovanje zaštite od apotoze koju pruža Bcl-2.^{13,14} Chittenden et al.¹³ su otkrili da je naglašeni izražaj *BAK-1* omogućio brzu i učinkovitu apoptozu fibroblasta bez seruma, implicirajući da *BAK-1*



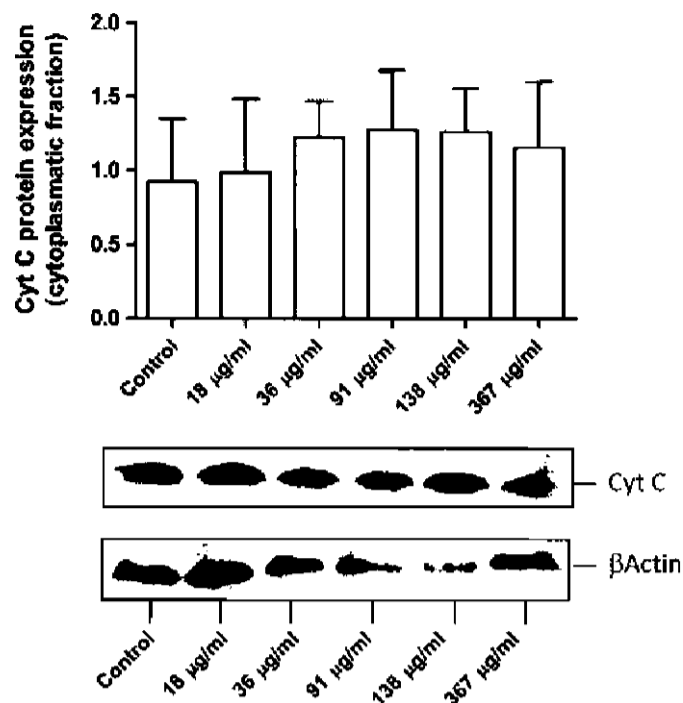
Slika. 4. Izražaj *BAK-1* u MCF7 ćelijama lizata nakon inkubacije sa različitim koncentracijama maitake D frakcije u trajanju od 24 sata. Analiza reakcije povratne-transkriptaze polimeraznog niza za *BAK-1* i β Actin je urađena korištenjem RNK dobivene iz vozno-tretiranog (kontrolnog) i 5 koncentracija maitake D frakcije MCF7 kultura ćelija. *BAK-1* je prilagođen navise mješavinom u dozno zavisnom načinu. Crtice odgovaraju odnosu intenziteta izražaja *BAK-1* gena nakon normalizacije na β Actin. Rezultati su reprezentativni za 3 neovisna eksperimenta. Statistički značajne razlike su otkrivene nakon inkubacije sa 3 najveće koncentracije D frakcije. * $P < .05$ vs. kontrole.

može biti direktno vezan za aktiviranje mehanizma odumiranja ćelija. Shodno tome, Kiefer et. al su izjavili da produkt *BAK-1* gena prvenstveno povećava smrt apoptoznih ćelija nakon odgovarajućeg stimulansa.¹⁴ Zapravo, tokom transdukcije apoptoznog signala u ćelije, promjena u permeabilnosti membrane mitohondrija prouzrokuje translokaciju pro-apoptoznog proteina citokroma c u citoplazmu. Zauzvrat, to aktivira proteotičke proteina koji izazivaju smrt koji se nazivaju kaspazi.

Članovi porodice Bcl-2, koji mogu biti i pro- i anti-apoptozni, regulišu smrt ćelija tako što kontrolišu permeabilnost membrane mitohondrija tokom apoptoze. Rezultati naše cDNK mikroanalize su pokazali da D frakcija iz maitake gljiva može prouzrokovati izražavanje 29 gena vezanih za apoptozu; 22 od njih su vezane za izazivanje apoptoze i 7 je vezano za anti-apoptozu ili regulaciju apoptoze. Pozitivni i negativni genetički i okolišni regulatori kontrolišu u ovisnosti da li je pro-apoptozni ili anti-apoptozni put izabran. Aktivacija pro-apoptoznih gena će dovesti do smrti ćelija, dok će deaktivacija gena blokirati puteve apoptoze. Naši rezultati su pokazali da genetička regulacija može biti modifikovana maitake liječenjem MCF7 ćelija raka dojke.

Naša studija je dokazala da je *BAK-1* osnovni put za disfunkciju mitohondrija koja je potrebna za smrt ćelija u odnosu na maitake MCF7 ćelije. Međutim, potrebno je više istraživanja kako bi se odredila tačna aktivacija apoptoze kao i njena regulacija. Otkrili smo da je pro-apoptozni veznik RNK VDAC-1 značajno neregulisan u MCF7 ćelijama liječenim maitake gljivama u dozno ovisnom načinu; povišile su se 2.6 puta na 367µg maitake po mL nakon 24 sata liječenja. Također smo otkrili da je maitake liječenje nereguliranih *Bcl-2-nalik 2* (13.21 puta povišeno u odnosu na kontrolu), gena koji su povezani za putem anti-apoptoze. 1999. godine, Shimizu et al.¹⁵ su dokazali da su rekombinarni pro-apoptozni protein Bax (Bcl2-vezani X protein) i *BAK-1* pospješili otvaranje VDAC, dok je anti-apoptozni protein BCLXL zatvoro VDAC tako što se direktno vezao za njega. Bax i *BAK-1* su dozvolili citokromu c da prođe kroz VDAC iz liposoma, ali put je prepriječio BCLXL. U skladu s ovim, VDAC-1-nedovoljna mitohondrija iz mutiranog kvasca nije prouzrokovala Bax/*BAK-1*-uzrokovani gubirak u gubitku membrane i ispuštanja citokroma c, jer su oba bila inhibirana od strane BCLXL. Shimizu et al.¹⁵ su zaključili također da se porodica proteina Bcl-2 veže za VDAC kako bi regulisala potencijal mitohondrijske membrane i ispuštanje citokroma c tokom apoptoze.

Na osnovu ovog rezultata, možemo pretpostaviti da maitake D frakcija stimulira ekspresiju gena *BAK-1* dozvoljavajući citokromu c da prođe kroz VDAC-1 iz liposoma u MCF7 ćelije. U ovoj studiji, otkrili smo da je VDAC-2 neregulisan tretmanom maitake u MCF7 ćelijama. Cheng et al. su izjavili da se *BAK-1* skuplja sa proteinima mitohondrijske vanjske membrane koja je vezana samo sa neaktivnim konformerom *BAK-1*.¹⁶ Ćelije koje manjkaju u VDAC-2 ali izražavaju prekomjerne količine VDAC-1 su pokazale povišeni izražaj



SLIKA. 5. Imunopupijanje za citokrom c nakon inkubacije sa maitake D frakcijom. Povećan izražaj citokroma c je primjećen nakon inkubacije sa povećanim dozama D frakcije, iako ovi rezultati nisu statistički značajni. Ekvivalentno nakupljanje proteina je potvrđeno ispitivanjem prugastih mrlja β Actin, kao što je prikazano. Donje slike predstavljaju reprezentativne uzroke Western mrlja iz 3 neovisna eksperimenta (n=6). Cyt c, citokrom C.

BAK-1.¹⁶ Suprotno tomu, prekomjerni izražaj VDAC-2 selektivno je spriječio aktivaciju *BAK-1* i inhibirao mitohondrični put apoptoze. Iz naših rezultata, možemo pretpostaviti da VDAC1 povećava izražavanje *BAK-1* u ćelijama MCF7 nakon liječenja maitake gljivama, međutim, neregulacija VDAC-2 može djelomice blokirati *BAK-1* protein i spriječiti smrt ćelija apoptozom u manje od 40% ćelija na 376µg D frakcije po mL, kao što je pokazano u rezultatima TUNEL analize. Ti rezultati pokazuju da 60% ćelija MCF7 tretiranih maitake gljivama će umrijeti kao rezultat apoptoze na maksimalnoj koncentraciji D frakcije nakon 24 sata tretmana.

BH3 interakcijski područni smrtni antagonist (BID) vijesnik RNK je bio neregulisan maitake liječenjem u MCF7 ćelijama (5.9 puta povećanje na 376µg/mL). Još jedna pro-apoptozna aktivnost se desila kroz citoplazmični protein, Bid. Ta molekula je nađena u citoplazmi u neaktivnom obliku. Kada je rascijepljena aktivnim kaspazom-8 iz vanjskog puta, Bid je prouzrokovao strukturnu promjenu Baxa, čineći ga sličnim strukturi anti-apoptozne molekule Bcl-2, i stoga dozvolio Baxu da se translocira na mitohondriju.¹⁷⁻²⁰ Signali smrti aktiviraju "samo BH3" molekule, kao što su tBID, BIM ili BAD, koji premještaju VDAC-2 iz *BAK-1*, dopuštajući homooligomerizaciju *BAK-1* i apoptozu.¹⁶ Stoga, možemo zaključiti da VDAC-2 reguliše aktivnost *BAK-1* i pruža vezu između mitohondrijske fiziologije i jezgrenog puta apoptoze.

Mnogi pro-apoptozni signali uključuju apoptoznu mašineriju tako što ispuštaju citokrome c iz mitohondrija.²¹⁻²⁴ cDNK podaci mikroanalize su pokazali prilagodbu navise apoptozne peptidaze aktivirajućeg faktora 1 interaktivnog proteina (APAF1) u ćelijama raka dojke nakon maitake tretmana u dozno ovisnom načinu. Citoplazmični citokrom c inducira oligomerizaciju APAF-1, što rezultira u regrutiranju i aktivaciji kaspaza 9 unutar apoptozoma.²⁵⁻²⁷ Kaspaz 9, zauzvrat, je poznati aktivator smanjujućih efektor kaspaza 3 i 7.²⁸

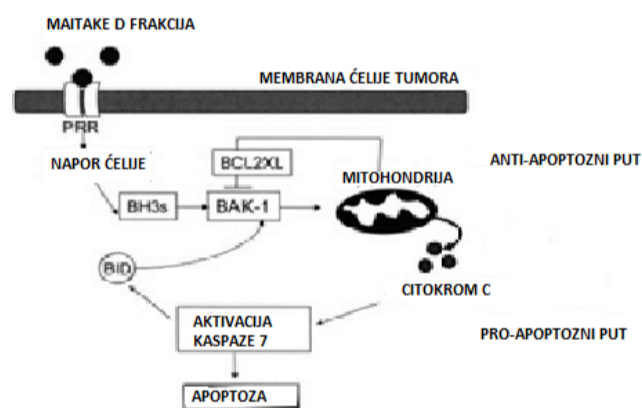
U konačnici, naša mikroanaliza cDNK je pokazala da su kaspaze 7 i kaspaza 1 apoptozno-vezani geni u ćelijama MCF7 koje nisu bile regulisane nakon maitake tretmana od 24 sata (24.5-, odnosno 10-puta povećanje, na 183µg/mL; $P < .001$) (podaci nisu prikazani). Dobro je poznato da su kaspazni protein ključni regulatorni i strukturni protein za proteolizu koja vodi do umiranja ćelija.²⁸

β -glukini nisu izraženi na ćelijama sisavaca i poznati su kao patogen-vezani molekularni modeli od strane receptora za prepoznavanje modela, prvenstveno C-tip lektin receptor dektin-1; oni također komuniciraju putem komplementarnog receptora 3 (CR3).²⁹⁻³² Dektin 1 je mali transmembranski receptor vrste II sa lektin-sličnim karbohidratnim domenom prepoznavanja koji preoznaje β 1,3-vezane i β 1,6-vezane glukane i netaknuti kvasac, dok je CR3 izražen β 2 integrin koji sadrži domenu lektina, koja posreduje prepoznavanje karbohidrata.²⁹⁻³² Frakcija D maitake gljiva je bogata sa

β 1,3-vezanim glukanima i vjerovano međudjeluje sa receptorom prepoznavanja modela na membrane ćelije. Još uvijek nije nađen poseban receptor za maitake na ćelijama sisavaca.

Na osnovu ovih rezultata, Slika 6 sažima putativni molekularni mehanizam vezan za aktivaciju apoptoze prouzrokovanu D frakcije *G frondosa* u ćelijama raka dojke. Maitake prouzrokuje signalni put za ćelije pod naporom nakon što je djelovao sa receptorom za prepoznavanje modela na membrane ćelije; on onda inducira aktivaciju pro-apoptoznog proteina *BAK-1* kroz aktivaciju BID kaspazama 1 ili 7 i kroz aktivaciju drugih BH3 aktivatorskih proteina. Aktivirani *BAK-1* proteini se oligomeziraju na membrane mitohondrija i prouzrokuju ispuštanje nekoliko mitohondrijskih faktora, kao što je citokrom c, koji u kombinaciji sa APAF-1 i prokaspazom 7, formira apoptozom. Aktivirana kaspaza 7 vjerovatno onda aktivira kaspazu 1, dozvoljavajući apoptozi da nastavi. Bcl-2L2 blokira aktivaciju *BAK-1* (Slika 6).

U zaključku, data studija je pokazala da D frakcija maitake gljiva ima jaka svojstva za borbu protiv raka u ćelijama raka dojke, i to radi tako što izražava pro-apoptozne učinke i smanjuje održivost ćelija tumora. To djelovanje je popraćeno povećanjem pro-apoptoznih gena, što je dalje potpognuto povećanjem izražaja *BAK-1* gena, ispuštanja citokroma c u citoplazmu, i aktivacije kaspaza 7 i 1. Imajući u vidu ustanovljene epidemiološke i okolišne nalaze o prirodnim molekulama, pogotovo mješavinama gljiva na razvoj raka ili odlaganje uznapredovanja, razumijevanje molekularnih mehanizama inherentnih u ovim učincima je od krajnje važnosti. Dato znanje može dovesti do razvijanja terapijskih ili preventivnih strategija za veoma česte neoplazije kao što je rak dojke.



Slika. 6. Putativni molekularni mehanizam aktivacije apoptoze induciran maitake u MCF7 ćelijama. Ova slika sumira rezultate dobivene u ovom radu. Izražaj gena vezan za apoptozne i anti-apoptozne puteve inducirane D frakcijom u MCF7 ćelijama je objašnjen u sekciji Diskusija. PRR, receptori prepoznavanja modela.

PRIZNANJA

Ova studija je djelomično fondirana od strane ERAB (EA-0641), Fundacao para a Ciencia e Tecnologia (PTDC_EME_PME_70155_2006), and CONICET, Argentina.

REFERENCE

- Parkin M: Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-543.
- Hishida I, et al. Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (maitake). *Chem Pharm Bull* 1988;36:1819-1827.
- Kodama N, Komuta K, Nanba H: Effect of maitake (*Grifola frondosa*) D-fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *Nutrition* 2005;21:624-629.
- Nanba H: Antitumor activity of orally administered D-fraction from maitake mushroom. *J Naturopathic Med* 1993;1:10-15.
- Ohno N, et al: Structural characterization and antitumor activity of the extracts from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 1985;33:3395-3401.
- Soares R, Guerreiro S, Botelho M: Elucidating progesterone effects in breast cancer: cross talk with PDGF signalling pathway in smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 2007;100:174-183.
- Greenie RT, Murray T, Boldin S, Wingo P: Cancer statistics 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7-23.
- Stewart BW, Kleihues P, eds. *World Cancer Report*. IARC Press, Lyon, France, 2003.
- Ramljak D, Romanczyk LJ, Metheny-Barlow L, et al: Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. *Mol Cancer Therap* 2005;4:537-546.
- Kozikowski AP, Tuckmantel W, Bottcher G, Romanczyk LJ Jr: Studies in polyphenol chemistry and bioactivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. *J Organic Chem* 2003;68:1641-1658.
- Shomori K, Yamamoto M, Arifuku I, Teramachi K, Ito H: Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (*Grifola frondosa*) on human gastric cancer cell lines. *Oncol Rep* 2009; 22:615-620.
- Liu X, Kim C, Yang J, Jemmerson R, Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
- Chittenden T., Harrington EA., O'Connor R., et al: Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue BAK-1. *Nature* 1995;374: 733-736.
- Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC., et al: Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue BAK-1. *Nature* 1995;374:736-739.
- Shimizu S., Narita M, Tsujimoto Y: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999;399:483-487.
- Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, et al: VDAC2 inhibits BAK-1 activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 2003;301: 513-517.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al: Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94:481-490.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, et al: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
- Gross A, Yin XM, Wang K, et al: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999;274:1156-1163.
- Ruffolo SC, Breckenridge DG, Nguyen M, et al: BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. *Cell Death Differ* 2000;7:1101-1108.
- Allan LA, Clarke PR: Apoptosis and autophagy: regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* 2009;276:6063-6073.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
- Kluck RM, Bossy-Wetzl E, Green DR, Newmeyer DD: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997;275:1132-1136.
- Yang Y, Liu X, Bhalla K, et al: Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al: Cytochrome c and dATP-dependent formation of APAF-1 / caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X: Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.
- Riedl SJ, Salvesen GS: The apoptosome: signaling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:405-U3.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:231-241.
- Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001;413:36-37.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S: Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 2003;197:1119-1124.
- Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced iso-forms. *J Biol Chem* 2001;276:43818-43823.
- Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NA: An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:67-78.