

საჯარო სამართლის იურიდიული პირი  
ი.ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი

**ნარმანია ნანა**

**RAS-პროტონკოცილის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენა  
ნერვული უჯრედის ტრანსკრიფციულ აქტივობაზე**

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის  
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

**დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა**

03.00.03 – მოლეკულური ბიოლოგია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:  
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი  
**დავით მიქელაძე**

თბილისი-2006

## დისერტაციის შინაარსი

შესავალი.

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა.

1. Ras-ის ბიოლოგიური მნიშვნელობა.
  - 1.1 Ras-ის სტრუქტურა და მოქმედების მექანიზმები.
  - 1.2 Ras-ის ფუნქცია უჯრედის რეგულაციურ პროცესებში.
  - 1.3 Ras-ის ნიტროზილირება.
  - 1.4 Ras-ის ფარნეზილირება.
  - 1.5 Ras-ის ტრანსფორმაცია.
2. სიგნალის გადაცემაში მონაწილე პროტეინკინაზები.
  - 2.1 პროტეინკინაზა ERK.
  - 2.2 პროტეინკინაზა Akt.
  - 2.3 პროტეინკინაზა JNK.
3. ტრანსკრიფციის ფაქტორები.
  - 3.1 STAT.
  - 3.2 Sp1.
  - 3.3 NF-kB.
    - 3.3.1 IκB.
  - 3.4 c-Jun.
  - 3.5 ATF-2.
  - 3.6 CREB.
  - 3.7 JunD.
  - 3.8 c-Fos.

თავი II. კვლევის მასალა და მეთოდები.

1. კვლევის რეაქტივები.
2. კვლევის მეთოდები.

თავი III. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.

1. Ras-ცილის მოდიფიკაციების (ფარნეზილირების და ნიტროზილირების) გავლენა მის GTP-აზურ აქტივობაზე.
2. აზოტის ოქსიდის სინთაზას და ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბირება ცვლის ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობას.

დასკვნები.

გამოყენებული ლიტერატურა.

## შესავალი

**პრობლემის აქტუალობა.** მრავალრიცხოვანი კლინიკური და ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე დადგინდა, რომ ადამიანებში სიმსივნური დაავადება უმრავლეს შემთხვევაში განპირობებულია პროტონკოგენების ფუნქციური დარღვევებით. მათი უმრავლესობა უჯრედის ზრდასა და დიფერენციაციას, მათ გამრავლებასა და პოპულაციებად ჩამოყალიბებას განსაზღვრავს. სხვადასხვა ტიპის ქიმიური, ფიზიკური და ვირუსული ზემოქმედების შედეგად პროტონკოგენში შეიძლება მოხდეს წერტილოვანი მუტაცია, რის შედეგადაც იგი ონკოგენად გარდაიქმნება. მისი ცილოვანი პროდუქტი ვეღარ უზრუნველყოფს უჯრედის ნორმალურ ფუნქციონირებას და იგი არარეგულირებად მდგომარეობაში გადადის.

პროტონკოგენების პროდუქტებს ზრდის ფაქტორების რეცეპტორულ სისტემაში მონაწილე ცილები და პეპტიდები წარმოადგენენ. ეს უკანასკნელნი აერთიანებენ ყველა იმ ცილოვან მოლეკულას, რომელსაც ინფორმაცია გადააქვს პლაზმური მემბრანიდან გენეტიკურ აპარატზე. ამრიგად, პროტონკოგენები და მათი ცილოვანი პროდუქტები ნორმალურ უჯრედში მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ და მათი საშუალებით რეალიზდება ზრდის და განვითარების პროგრამა. პროტონკოგენებში მომხდარი გენეტიკური ცვლილებები – ჩანართები, დელეციები, მუტაციები და რეკომბინაციები – იწვევენ უჯრედის ძირითადი პროგრამის დარღვევას, მისი რეგულაციის დაქვეითებას და გადაჭყავთ იგი არაკონტროლირებად მდგომარეობაში.

Ras ცილები მიეკუთვნებიან ე.წ. პროტონკოცილების ოჯახს, რომლებიც წარმოადგენენ მნიშვნელოვან კომპონენტებს უჯრედშიდა სასიგნალო გზებში და აკონტროლებენ ისეთ პროცესებს, როგორცაა პროლიფერაცია, დიფერენციაცია და უჯრედის პროგრამირებული სიკვდილი [Bredel et al. 1999]. წარმოადგენენ რა GTP-დამაკავშირებელი ცილების ოჯახს, ისინი განიხილებიან როგორც უჯრედული პასუხების მოლეკულური გადამრთველები. Ras-ის ფუნქციის უმართავობა, რომელსაც ადგილი აქვს მისი გენის მუტაციების, დელეციების ან ზეექსპრესიების დროს აღინიშნება ადამიანთა სიმსივნური დაავადებების შემთხვევათა 30%-ში, სადაც ისინი

პასუხისმგებელი არიან ნეოპლასტიკური ტრანსფორმაციის პათოგენეზზე [Paul 1986, Altschuler 1993, deVries 1996, Frame 2001].

ნაჩვენებია აგრეთვე, რომ Ras-ის აქტივაციას ადგილი აქვს ნერვული სისტემის ანთებითი დაავადებების დროს, და მისი კორექცია მნიშვნელოვან ეფექტს ავლენს ნეიროპათოლოგიების თერაპიაში. მეორე მხრივ დადგენილია, რომ თავის ტვინში მიმდინარე იშემიური მოვლენები დაკავშირებულია Ras გზით სიგნალის გადაცემის ცვლილებებთან, რასაც ნერვული უჯრედების დაზიანება მოჰყვება [Takai et al. 2001].

უახლესი მონაცემების საფუძველზე შესაძლებელია ითქვას, რომ Ras პროტონკოცილას ცენტრალური ადგილი უჭირავს მრავალი ნაერთის ნეიროტოქსიკურ ეფექტებში, რაც ხორციელდება გარკვეული ტიპის პროტეინკინაზური კასკადების მეშვეობით პროაპოპტოზური სიგნალის გადაცემის გზით. უფრო მეტიც, როგორც ირკვევა ეს ცილა წარმოადგენს ერთგვარ მოლეკულურ გადამრთველს უჯრედში და არეგულირებს არა მარტო პრო-, არამედ ანტიაპოპტოზურ სასიგნალო გზების მიმდინარეობას [Rebollo A. et al. 1999]. ნანახია, რომ იგი ჩართულია მრავალი ტიპის ნეიროპროტექციულ ეფექტებში, რაც კიდევ უფრო მნიშვნელოვანს ხდის ამ ცილის ფუნქციის შესწავლას. უჯრედშიდა სასიგნალო პროცესებში Ras პროტონკოცილის როლის ზუსტი განსაზღვრა გაძნელებულია მისი მრავალი პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების არსებობის გამო, რომელთა მნიშვნელობა სარეგულაციო პროცესებში ბოლომდე შესწავლილი არ არის. ამ კუთხით განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება Ras-ის ორმაგი (პრო- და ანტიაპოპტოზური) ბუნების მარეგულირებელი ნატიფი მექანიზმების განსაზღვრას, რაც შემდგომში საფუძველს მოგვცემს განვსაზღვროთ ზოგიერთი პათოლოგიური პროცესის მიზანმიმართული კორექცია მოლეკულურ დონეზე.

ამრიგად, Ras და მისი კასკადი ერთ-ერთ მთავარ რეგულაციურ სისტემას წარმოადგენს, რადგან მისი აქტივაცია უჯრედის ფუნდამენტურ ცვლილებებთან არის დაკავშირებული. საინტერესოა Ras პროტონკოცილის გააქტივების შედეგად სხვადასხვა აპოპტოზური და ანტიაპოპტოზური გზების ცვლილებების შესწავლა, რომელშიც ჩართულია მრავალი ტრანსკრიფციული ფაქტორი.

Ras-ცილა, რომლის გენის მუტაციაც განაპირობებს ონკოგენურ ტრანსფორმაციას, იწვევს ერთის მხრივ უჯრედების აპოპტოზს, ხოლო მეორე მხრივ სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას. Ras-ის ორმაგი მოქმედება განისაზღვრება მისი მიმართულებით და დადმავალ რეგულაციურ სისტემებზე ზემოქმედებით. Raf/MEK/ERK გზის გააქტივებით Ras იწვევს აპოპტოზს, ხოლო PI3/Akt გზით კი იგი უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ზრდის. Ras-ის ეფექტი ტრანსკრიპციული ფაქტორების შერჩევით აქტივაციაში აისახება, რომლებიც პრო- ან ანტი-აპოპტოზური გენების ექსპრესიას იწვევენ.

Ras-ის აქტივობა რეგულირდება სხვადასხვა ტიპის პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაციით, რომელთა შორისაც მნიშვნელოვანია ცილოვანი მოლეკულის ფარნეზილირება და ნიტროზილირება. ამ მოდიფიკაციების მნიშვნელობა Ras-ის მოქმედების მიმართულებაში არ არის ცნობილი.

ამრიგად, Ras-ის ცილოვანი კასკადი წარმოადგენს უჯრედშიდა რეგულაციურ სისტემას, რომელიც პასუხობს მრავალი ტიპის გალიზიანებას, და რომელზეც გადაიკვეთება უჯრედისათვის საციცოხლო მნიშვნელობის პრო- და ანტი-აპოპტოზური გზები [Frame et al. 2001]. Ras-ის ფუნქციონის მოლეკულური საფუძვლების გარკვევა, პათოლოგიურ პროცესებში მისი მნიშვნელობის დადგენა თანამედროვე ბიომედიცინის ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემას წარმოადგენს.

**კვლევის მიზანი და ამოცანები.** ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა Ras-პროტოონკოცილის ორი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის – ნიტროზილირების და ფარნეზილირების როლის შესწავლა ამ ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე და მისი დადმავალი სასიგნალო ეფექტორების სპეციფიკურობაზე პროტეინკინაზულ და ტრანსკრიფციულ დონეზე. ზემოაღნიშნული მიზნის შესასრულებლად დასახული იქნა შემდეგი ამოცანები:

– ხარის თავის ტვინის ქერქსა და ჰიპოკამპიდან ციტოზოლური (არამოდიფიცირებული) და მემბრანული (ფარნეზილირებული) Ras-პროტოონკოცილის გამოყოფა და გასუფთავება ქრომატოგრაფიის მეშვეობით.

– მიღებული სუფთა ციტოზოლური პრეპარატის GTP-აზური აქტივობის შესწავლა ნიტროზილირების და ფარნეზილირების გავლენის ქვეშ.

– მიღებული სუფთა მემბრანული პრეპარატის GTP-აზური აქტივობის შესწავლა მისი ნიტროზილირების პირობებში.

– დაგვედგინა Ras-პროტონკოცილის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენა პროტეინკინაზების ფოსფორილირების დონეზე და შესაბამისად, პროტეინკინაზური კასკადების აქტივაციაზე.

– შეგვესწავლა Ras-პროტონკოცილის ფარნეზილირების და ნიტროზილირების გავლენა ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობაზე.

– დაგვედგინა სავარაუდო სპეციფიკური დადმავალი რეგულატორები არამოდიფიცირებული, ნიტროზილირებული, ფარნეზილირებული და ორმაგად მოდიფიცირებული Ras-პროტონკოცილისთვის.

**ნაშრომის მეცნიერული სიახლე.** შესწავლილია GTP-აზური აქტივობის ცვლილება პარალელურად მემბრანულ და ციტოზოლური Ras-პროტონკოცილის შემთხვევაში. პირველად არის ნანახი ნიტროზილირების საპირისპირო ეფექტი GTP-აზურ აქტივობაზე მემბრანულ და ციტოზოლურ Ras-პროტონკოცილას შორის, რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს 186-ე ცისტეინის ნაშთის მოდიფიცირების მნიშვნელობას. ნანახია ფარნეზილირების მასტიმულირებელი გავლენა Ras-პროტონკოცილის ბიოლოგიურ აქტივობაზე. პირველად ნერვული უჯრედის მაგალითზე ნაჩვენებია პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციის (ნიტროზილირების და ფარნეზილირების) გავლენა Ras-პროტონკოცილის დადმავალი ეფექტორების (პროტეინკინაზები, ტრანსკრიფციული ფაქტორები) სპეციფიკურობაზე. შესწავლილია რვა მნიშვნელოვანი ტრანსკრიფციული ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილება ზემოაღნიშნული მოდიფიკაციების გავლენით.

**სამუშაოს პრაქტიკული ღირებულება.** ჩატარებული კვლევის შედეგები გარკვეულ ინტერესს წარმოადგენს როგორც ფუნდამენტური, ასევე კლინიკური მედიცინისათვის. კერძოდ, ნევროლოგიისა და ონკოლოგიისათვის. Ras-პროტონკოცილის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენის ზუსტი მექანიზმის და ეფექტის შესწავლა, შემდგომში საშუალებას მოგვცემს შევიმუშაოთ ისეთი ფარმაკოლოგიური საშუალებები, რომლებიც მოახდენენ პროაპოპტოზური პროცესების გადართვას ანტიაპოპტოზურზე და პირიქით. კერძოდ, ამჟამად უკვე იწყება ფარნეზილირების

ინჰიბიტორების გამოყენება ონკოლოგიაში ტრანსფორმაციული პროცესების შესაჩერებლად და ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები შეიძლება გამოყენებულ იქნას ამ ნაერთების სწორი კლინიკური ინტერვენციისათვის.

აგრეთვე მნიშვნელოვანია ნეიროდეგენერაციული დაავადებების თერაპიაში. ამ შემთხვევაში შეიძლება გამოყენებულ იქნას ისეთი ფარმაკოლოგიური საშუალებები, რომლებიც იმოქმედებენ Ras-პროტონკოცილებზე და გადართავენ უჯრედულ სიგნალს გადარჩენის გზაზე.

ამგვარად, Ras-პროტონკოცილის მოდიფიცირება და მისი ზუსტი მოლეკულური მექანიზმების დადგენა აუცილებელია მისი დაღმავალი ეფექტორების სპეციფიკურობის გამოსავლენად და შემდგომში მრავალი დაავადების თერაპიასა ან კლინიკური სურათის კორექციისათვის.

## თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1. Ras-ის ბიოლოგიური მნიშვნელობა

#### 1.1 Ras – ის სტრუქტურა და მოქმედების მექანიზმები

მცირე მოლეკულური მასის მქონე GTP-დამაკავშირებელი ცილები (ან უბრალოდ მცირე G ცილები) წარმოადგენენ მონომერულ G ცილებს მოლეკულური მასებით 20-40 კდა. მათი პირველი წარმომადგენლები – Ha (Harvey)-Ras და Ki (Kirsten)-Ras გენები თავდაპირველად აღმოჩენილი იყო 80-იანი წლების დასაწყისში, როგორც სარკომის ვირუსების v-Ha-Ras და v-Ki-Ras ონკოგენები [Shih et al. 1978]. მათი უჯრედული ონკოგენები იყო იდენტიფიცირებული ადამიანშიც და მათი მუტაციები ნანახი იყო ადამიანის კარცინომის ზოგიერთ ფორმაში [Der et al.1982]. როგორც შემდგომში აღმოჩნდა, ეს მუტირებული ფორმები ასტიმულირებენ კულტივირებული უჯრედების პროლიფერაციასა და ტრანსფორმაციას, უფრო მეტიც, ისინი იწვევენ ნეირონული უჯრედების დიფერენცირებას.

ამჟამად აღმოჩენილია 100-ზე მეტი მცირე G ცილა, რომლებიც იდენტიფიცირებულია ეუკარიოტებში, დაწყებული საფუვრიდან დამთავრებული ადამიანით, და ისინი ქმნიან ერთ დიდ ზეოჯახს [Takai et al, 1992]. ამ ზეოჯახის წევრები

კლასიფიცირდება 5 ოჯახში: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf და Ran ოჯახები. ამ ცილებს ახასიათებს GTP/GDP დამაკავშირებელი GTP-აზური აქტივობა, უმრავლეს შემთხვევაში GTP-აზური აქტივობა საჭიროა მცირე G ცილების ფუნქციის ტერმინაციისათვის და არ არის აუცილებელი თვითონ ამ ფუნქციის შესასრულებლად.

Ras პროტონკოცილის მაკოდირებელი გენი ერთ-ერთ ცნობილ პროტონკოგენს წარმოადგენს. მისი ცილოვანი პროდუქტი G-ცილების ოჯახს მიეკუთვნება და გუანინის ნუკლეოტიდებს იკავშირებს. Ras ცილა წარმოადგენს GDP/GTP დამოკიდებულ ცილას, რომლის მოლეკულური წონა 21 კილოდალტონის ტოლია. იგი სუსტად არის დაკავშირებული პლაზმურ მემბრანასთან ციტოპლაზმის მხრიდან და თავისუფლად ძვრება მასზე გარკვეული ზემოქმედებისას. იგი წარმოადგენს მაღალი ექსპრესიის მქონე ცილას განვითარებადი და ზრდასრული ორგანიზმის ნერვულ სისტემაში, მნიშვნელოვან როლს თამაშობს უჯრედის ზრდის ფაქტორებზე პასუხის განვითარებაში [Aktories et al, 1988, Albert et al, 1999]. Ras ცილების აქტივაცია აუცილებელია იმ სასიგნალო გადაცემის გზებისათვის, რომლებსაც მივყავართ უჯრედის პროლიფერაციამდე. გარდა ამისა, აღმოჩნდა, რომ Ras ცილები მონაწილეობენ აპოპტოზისა და უჯრედული ციკლის რეგულაციის გზებშიც [Altschuler et al, 1993]. Ras-ის ფუნქცია აუცილებელია ადრეულ და გვიანი G<sub>1</sub> ფაზიდან S ფაზაში გადასვლისათვის [Altschuler et al, 1998].

Ras პროტონკოცილა ფართოდ გავრცელებულია ძუძუმწოვართა უჯრედებში, მაგრამ მისი ექსპრესიის დონე შეიძლება იცვლებოდეს უჯრედების ტიპის მიხედვით. Ras ცილის ლოკალიზაცია უჯრედში დამოკიდებულია მისი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის ტიპზე. მოდიფიცირებული მოლეკულის ლიპიდური კუდები ურთიერთქმედებენ მემბრანის ფოსფოლიპიდების აცილურ კუდებთან.

ამჟამად ცნობილია Ras პროტონკოცილის 3 ფორმა: Ha-Ras, Ki-Ras (Ki-Ras აქვს ორი იზოფორმა: A და B) და N-Ras, რომელთა წერტილოვანი მუტაციები სავარაუდოდ ჩართულია ძუძუმწოვართა უჯრედების ტრანსფორმაციაში [Brown et al, 1984]. მათი შესაბამისი გენებია H-ras, K-ras და N-ras, რომლებიც ექსპრესირდებიან სხვადასხვა ქსოვილსა და უჯრედებში განსხვავებული ინტენსივობით [Leon J. et al, 1987]. *ras* გენების მიერ კოდირებული პროდუქტი არის 188 ამინომჟავისაგან შემდგარი ცილა (189



ამინომჟავა K-Ras(B)- შემთხვევაში). p21 ცილები, რომლებიც კოდირებულნი არიან ადამიანის სამი გენით, ჰომოლოგიურები არიან პირველი 164 ამინომჟავით, სადაც პირველი 86 N-ბოლოში იდენტურია, ხოლო შემდგომ 78-ში იდენტურობა 79%-ია. ისინი მთლიანად განსხვავდებიან C-ბოლოში განლაგებული 25 ამინომჟავით. (ერთადერთი გამონაკლისია 189-ე ცისტეინი). ამიტომ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის 165-185 უბანს ჰეტეროგენული რეგიონი ჰქვია [Lowy D.R. et al, 1993]. Ras-ის ბიოლოგიური აქტივობა ძირითადად განისაზღვრება მისი ეფექტორული დომენით (32-40), რომელიც იკავშირებს სხვადასხვა ეფექტორულ მოლეკულებს [Wittinghofer A. et al, 1991], თუმცა ხუთი ერთმანეთისაგან დაშორებული სეგმენტი: 5-63, 77-92, 109-123, 139-165 და C-ტერმინალური CAAX-უბანი [Leon J. et al, 1987; Lowy D.R. et al, 1993] აგრეთვე აუცილებელია Ras-ის ფუნქციონირებისათვის.

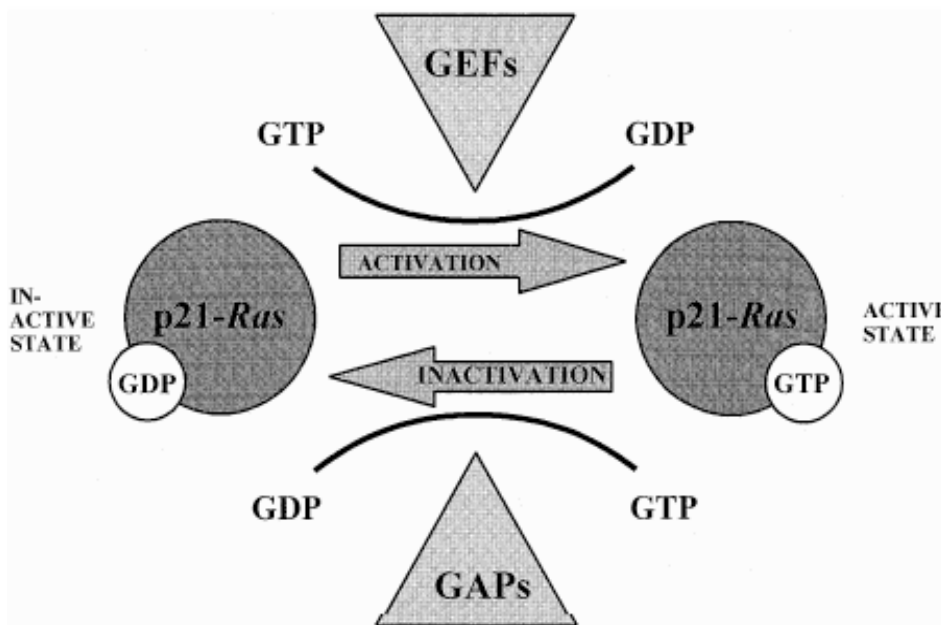
ამრიგად, უშუალოდ Ras ოჯახის წევრები არიან: c-H-Ras, c-N-Ras, c-K(A)-Ras და c-K(B)-Ras და ისინი წარმოადგენენ ცენტრალურ მოლეკულურ გადამრთველებს, რომლებიც არეგულირებენ უჯრედში მრავალ ბიოლოგიურ პროცესებს [Shields J. M. et al, 2000; M. Barbacid 1987].

Ras-პროტოონკოცილის როლის შესასწავლად მკვლევარების უმეტესობა იყენებს c-H-Ras იზოფორმას, როგორც „მოდელურ“ Ras ცილას. გენეტიკურმა კვლევამ აჩვენა, რომ ემბრიოგენეზის პროცესში c-K-Ras-ის მაკოდირებელი გენის გაწყვეტა იწვევს ემბრიონულ ლეტალურ ფენოტიპს, რასაც ადგილი არა აქვს c-H-Ras-ის ან c-N-Ras-ის შემთხვევაში. ეს ფაქტი მიგვიჩვენებს Ras-ის იზოფორმებს შორის ფუნქციურ სხვაობაზე [Esteban L. M. et al, 2001; Jmanoff H. et al, 1995].

რაც შეეხება Ras ცილების სტრუქტურას, მათ აქვს GDP/GTP დამაკავშირებელი უბანი და GTP-აზური აქტივობის მქონე უბანი, COOH ბოლოზე მდებარე უბანი, რომელიც განიცდის პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციებს ლიპიდებით (როგორცაა ფარნეზილირება, გერანილგერანილირება, პალმიტოილირება), აგრეთვე მეთილირებას და პროტეოლიზს [Takai et al, 2001].

მოდიფიცირებადი უბანი შეიცავს Cys-A-A\_X თანმიმდევრობას, სადაც Cys - ცისტეინი, A – ალიფატური მჟავა, ხოლო X – ნებისმიერი ამინომჟავა. ფარნეზილირება ხდება ცისტეინის ნაშთზე და A-A-X პროტეოლიზურად სცილდება, რის შემდეგადაც

გამიშვებული ცისტეინი განიცდის კარბოქსიმეთილირებას [Takai et al, 2001]. Ha-Ras ცილას აქვს დამატებითი ცისტეინის ნაშთი, რომელიც შემდგომში პალმიტირდება. Ras ცილების ლიპიდური მოდიფიკაციები აუცილებელია მისი მემბრანასთან და რეგულატორებთან დასაკავშირებლად და შესაბამისი დადმავალი ეფექტორების გასააქტივებლად [Magee et al, 1992].



**სურათი 1. Ras პროტონკოცილის GTP-აზური აქტივობა**

Ras ცილას ორი ფუნქციური მდგომარეობა გააჩნია: GDP-თან დაკავშირებული (არააქტიური) და GTP-თან დაკავშირებული (აქტიური). როდესაც Ras-ის ცილოვან მოლეკულაში GDP იცვლება GTP-ით, იგი აქტიური ხდება (სურათი 1).

აღმავალი ეფექტორებიდან სიგნალის მოსვლისას ხდება Ras-GDP-კომპლექსის დისოციაცია და ცილასთან GTP-ის დაკავშირება, რასაც მოჰყვება კონფორმაციული ცვლილება დადმავალი ეფექტორების დამაკავშირებელ უბნებში და იგი უკავშირდება შესაბამის დადმავალ ეფექტორებს, რაც თავის მხრიდან იწვევს ამ მოლეკულების ფუნქციების ცვლილებას. GTP-დაკავშირებული ფორმა მოლეკულის GTP-აზური

აქტივობის წყალობით გადადის GDP-დაკავშირებულ ფორმაში, რომელიც შემდეგ ანთავისუფლებს დადმავალ ეფექტორულ მოლეკულებს. ამ ერთი ციკლის შესრულებისას Ras ცილა გადამრთველივით გადასცემს სიგნალს უჯრედის შიგნით.

Ras-ის გააქტივება ადაპტორული SH2-დომენის მქონე ცილების საშუალებით ხდება, მაგრამ მათი მოქმედება არაპირდაპირია. ისინი ჯერ ე.წ. შუალედურ ცილებთან ურთიერთქმედებენ, ხოლო შემდეგ Ras-თან. ადაპტორულ ცილებს SH2 რეგიონის გარდა მეორე სპეციფიკური უბანიც აქვთ. ეს უბანი დიდი რაოდენობით ამინომჟავა პროლინს შეიცავს და ამიტომ მისი  $\alpha$ -სპირალი გაშლილია. ამ უბნის მქონე ადაპტორული ცილები შუალედურ ცილას უკავშირდებიან და მხოლოდ ამის შემდეგ Ras-ის მოლეკულას გადაეცემა კონფორმაციული ცვლილებები. შუალედურ ცილებს მიეკუთვნებიან: GRF, SOS, VAV და სხვა. ამრიგად, ყალიბდება რთული, ოთხი ცილისაგან შემდგარი კომპლექსი, რომლის აშენებაც რეცეპტორიდან იწყება და Ras-ით მთავრდება.

GDP/GTP ცვლის სიჩქარის მალიმიტირებელ საფეხურს წარმოადგენს GDP-ის დისოციაცია. ეს პროცესი ძალიან შენელებულია და სტიმულირდება სპეციფიკური შუალედური ცილებით – GEF-ებით (guanine nucleotide exchange factor), რომლის აქტივობა რეგულირდება ადმავალი რეგულატორებით. ეს ფაქტორი ჩანაცვლებს GDP-ის მოლეკულას Ras ცილასთან კომპლექსში, ხოლო შემდეგ ადგილს უთმობს GTP-ს. GEF-ების უმრავლესობა არის სპეციფიკური მცირე G ცილების ცალკეული ქვეოჯახისათვის. მაგალითად, SOS ცილა (ე.წ. “Son of Sevenless”) არის Ras-სპეციფიკური გუანიდინის ნუკლეოტიდების ცვლის ფაქტორი, მაგრამ ცილების ამ კლასის ზოგიერთ წარმომადგენელს აქვს ფართო სუბსტრატული სპეციფიკურობა [Hart et al, 1991]. ამჟამად ცნობილია Ras-სპეციფიკური GEF-ის 3 ტიპი: SOS, Cdc25 და Ras-GRF (guanidine nucleotide releasing factor). ეს უკანასკნელი წარმოადგენს თავის ტვინისათვის სპეციფიკურ გუანიდინის ნუკლეოტიდების ცვლის ფაქტორს და სავარაუდოდ მონაწილეობს სინაფსურ პლასტიკურობაში, კერძოდ ხანგრძლივ პოტენციაციაში (LTP) [Manabe et al, 2000].

შუალედური ცილების კიდევ ერთი წარმომადგენელი – SOS წარმოადგენს ეპიდერმალური ზრდის ფაქტორის (EGF) რეცეპტორის ჰომოლოგის – Sevenless ცილის დადმავალ ეფექტორს და მისი სტრუქტურა ყველაზე კარგად არის შესწავლილი [Ridley

et al, 1992]. მისი მოლეკულა შეიცავს ფლექსტრინის ჰომოლოგიურ (PH) დომენს, რომელიც ურთიერთქმედებს მემბრანის ფოსფოლიპიდებთან და განსაზღვრავს SOS-ის ლოკალიზაციას, ერთი GEF დომენი მოლეკულის ცენტრალურ ნაწილში და GRB2-დამაკავშირებელი უბანი C-ბოლოზე. SOS ცილის აქტივობა ძირითადად ვრცელდება Ha-Ras და Ki-Ras მოლეკულებზე.

მას შემდეგ, რაც Ras ცილის GTP-დაკავშირებული ფორმა გამოავლენს თავის ეფექტს დაღმავალ რეგულატორზე, იგი გარდაიქმნება GDP-დაკავშირებულ ფორმად. მაგრამ მექანიზმები, რომლითაც ხორციელდება Ras ცილის სიგნალის დამთავრება ბოლომდე ცნობილი არ არის. Ras ცილების GTP-აზური აქტივობის სიჩქარე ასევე საკმაოდ დაბალია და სტიმულირდება თავის მხრივ მეორე სახის რეგულატორული მოლეკულებით – GAP-ებით (GTP-ase activating protein), რომელთა უმრავლესობას აგრეთვე ახასიათებს სუბსტრატული სპეციფიკურობა ცილების ზეოჯახების მიხედვით.

ამგვარად, Ras ცილის აქტივობა რეგულირდება ორი ტიპის მოლეკულებით – GEF და GAP ცილებით, რომელთა აქტივაცია თავის მხრივ ხდება მრავალი უჯრედგარე სიგნალების საპასუხოდ. ერთ-ერთ ასეთ მექანიზმს წარმოადგენს თიროზინკინაზასთან ასოცირებული რეცეპტორის გააქტივება, რასაც მოჰყვება ადაპტორული ცილების (GRB2 და SHC/GRB2 კომპლექსის) თიროზინის ნაშთების ფოსფორილება და Ras ცილის ყველაზე დამახასიათებელი გუანიდინის ნუკლეოტიდების ცვლის ფაქტორის SOS ცილის ამოტივტივება ციტოზოლიდან. მემბრანასთან იქმნება რეცეპტორი-ადაპტორი-ცილოვანი ფაქტორის კომპლექსი, რომელიც ასტიმულირებს მემბრანასთან ასოცირებულ Ras-ის მოლეკულას და ააქტივებს მას [Takai et al, 2001].

უნდა ითქვას, რომ ის რეცეპტორებიც, რომლებიც მოკლებულნი არიან თიროზინკინაზურ აქტივობას, აგრეთვე მოქმედებენ Ras პროტონკოცილაზე. ეს ეფექტი სავარაუდოდ ხორციელდება Src მსგავსი თიროზინკინაზებით ან რეცეპტორული თიროზინკინაზების ლიგანდ-დამოუკიდებელი აქტივაციის გზით [Graves et al, 1992; Straus et al, 1992]. აგრეთვე ნანახია, რომ ზოგიერთი G ცილასთან შეუღლებელი რეცეპტორი ( $\alpha$ -ადრენერგული, მუსკარინული აცეტილქოლინის რეცეპტორები და სხვა) ააქტივებს Ras ცილებს მსგავსი მოლეკულური მექანიზმებით [Hawes et al, 1995]. ამასთან ერთად ნეირონებში აღმოჩენილია გუანიდინის

ნუკლეოტიდების ცვლის ფაქტორების ერთ-ერთი წარმომადგენელი p140 Ras-GRF, რომლის IQ თანამიმდევრობა რეგულირდება  $Ca^{2+}$ /კალმოდულინით და აქტივდება უჯრედში  $Ca^{2+}$ -ის იონების შემოსვლის საპასუხოდ.

Ras ცილის აქტივაციის რეგულაციის ერთ-ერთ სავარაუდო გზად აგრეთვე შეიძლება ჩაითვალოს Ras-GRF მოლეკულის გააქტივება ლიპოფოსფორმქავით (LPA). LPA ზრდის აქტიური Ras-GTP ფორმის კონცენტრაციას უჯრედში. ნაჩვენებია, რომ ამ შემთხვევაშიც აუცილებელია კალმოდულინის და თავისუფალი  $Ca^{2+}$ -ის იონების არსებობა უჯრედში [Zippel et al, 2000].

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად Ras პროტონკოცილის აქტივაციის ხარისხის რეგულაცია აგრეთვე ხორციელდება NMDA ტიპის გლუტამატის რეცეპტორით და მასთან ასოცირებული მაღალმოლეკულური ცილოვანი კომპლექსის მეშვეობით, მისი GEF მოლეკულებზე მოქმედების გზით [Yun et al, 1998].

Ras პროტონკოცილის რეგულაცია შესაძლოა ხდებოდეს GAP-ების საშუალებითაც. GAP მოქმედებს Ras-ის მოლეკულაზე, როგორც უარყოფითი რეგულატორი. ზოგიერთ შემთხვევაში GTP-აზის გამაქტივებელი ცილა ქმნის კომპლექსს თრომბოციტების ზრდის ფაქტორის (PDGF – platelet-derived growth factor) რეცეპტორთან, რომელიც თავის მხრივ თიროზინკინაზური აქტივობით აფოსფორილებს მას. GAP-ების როლი უჯრედის მეტაბოლიზმის რეგულაციის პროცესებში ბოლომდე შესწავლილი არ არის. ცნობილია, რომ ამ ცილის გენის ნეგატიური მუტანტები კვდებიან ემბრიოგენეზში, რაც შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ენდოთელური უჯრედების სისხლძარღვოვან ქსელში ორგანიზების უნარის მკვეთრი დარღვევით და ნეირონების მასიური დაღუპვით.

ამრიგად, ოლიგომერული ფორმირების შემდეგ Ras-ის მოლეკულაში GDP-ი ჩაინაცვლება GTP-ით და იგი აქტიურ კონფორმაციას იღებს. აქტიურ მდგომარეობაში მყოფი Ras-ი ჩამოსცილდება კომპლექსს და მოქმედებას იწყებს ფერმენტთა სისტემაზე, რომელსაც ციტოპლაზმური პროტეინკინაზური კასკადი, ანუ მიტოგენებით აქტივირებადი პროტეინკინაზური (MAP) კასკადი ეწოდება. MAP-ის კასკადი უნიკალურ ურთიერთმანათლებლობის პროტეინკინაზების ჯაჭვს წარმოადგენს,

რომელიც ციტოპლაზმაშია განთავსებული და რომლის გააქტივებაც მიტოზის ინიციაციასთან არის დაკავშირებული.

ამრიგად, Ras და მისი კასკადი უჯრედის ერთ-ერთ მთავარ რეგულაციურ სისტემას წარმოადგენს, რადგან მისი აქტივაცია უჯრედის ფუნდამენტურ ცვლილებებთან არის დაკავშირებული.

### *1.2 Ras-ის ფუნქცია უჯრედის რეგულაციურ პროცესებში*

GTP-დაკავშირებული ცილები არეგულირებენ სხვადასხვა უჯრედშიდა პროცესებს. კონსესუსამდგა მისული ის აზრი, რომ Ras-ის სხვადასხვა იზოფორმები განაპირობებენ სხვადასხვა ბიოლოგიურ შედეგებს. რიგმა თანამედროვე კვლევებმა აჩვენა, რომ c-K-ras გენის პროდუქტი თამაშობს უფრო წამყვან როლს Rac-ის აქტივაციაში, ვიდრე Ras ცილის სხვა იზოფორმები [Voice J. K. et al, 1999]. Rac-ი წარმოადგენს GDP-დამაკავშირებელი ცილების ოჯახის წარმომადგენელს. იგი მონაწილეობს უჯრედის ძვრადობაში, მორფოლოგიურ ცვლილებებში და ორგანოიდების ტრანსლოკაციაში.

c-K-Ras-ის ზეექსპრესიის შედეგია რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) დონის დაბლა დაწევა  $H_2O_2$ -ის საპასუხოდ. ეს c-K-Ras სპეციფიური ეფექტი მიიჩნის მანგანუმ-დამოკიდებული სუპეროქსიდდისმუტაზას (Mn-SOD) მასტაბილიზირებლად [Santillo M. et al, 2001], რადგანაც c-K(B)-Ras-ს აქვს რა კონტროლი Rac-GTP დონეზე, იგი არეგულირებს უჯრედების მიგრაციას [Voice J. K. et al, 1999].

სხვა in vitro კვლევები გვიჩვენებენ, რომ ონკოგენური c-H-Ras და c-K(A)-Ras უფრო აქტიური არიან ადჰეზიური პოტენციალის მქონე უჯრედებში, მაშინ როცა c-K(A)-Ras და c-N-Ras-ის ტრანსფორმირებული ფორმები უფრო მნიშვნელოვანი არიან ადჰეზიისაგან დამოუკიდებელი ზრდის ინდუცირებაში [Voice J. K. et al, 1999]. ლიტერატურაში აგრეთვე არსებობს მონაცემები, რომ c-H-Ras ასტიმულირებს ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზას და არის უფრო მგრძნობიარე Ras-გუანინ-ნუკლეოტიდ-გამომყოფი ფაქტორის აქტივობის მიმართ, ვიდრე სხვა Ras ცილები [Jones

M. K. et al, 1998; J. Yan et al, 1998.]. ონკოგენურ c-H-Ras-ს არ სჭირდება პირდაპირი ურთიერთქმედება სერინ-ტრეონინ-კინაზა Raf-1-თან ტრანსფორმირებული ფენოტიპის საწარმოებლად. ფაქტიურად, კონსტიტუციური მიტოგენ-აქტივირებადი პროტეინკინაზის (MAPK) მოქმედება ონკოგენურ c-H-Ras ტრანსფორმირებულ უჯრედში, რომელიც დამოკიდებულია ექსპრესირებული ონკოგენური c-H-Ras-ის რაოდენობაზე ხდება ნაწილობრივ იმის გამო, რომ c-H-Ras პირდაპირ ურთიერთქმედებს Rasf-1-თან [Hamilton M. et al, 1998.]. ეს კიდეც ერთხელ ადასტურებს იმ მოსაზრებას, რომ ერთი ონკოგენური Ras ცილა ვერ შეცვლის Ras-იზოფორმების ფუნქციებს, რაც არ უნდა დიდი რაოდენობით მოხდეს მისი ექსპრესია.

არსებობს მონაცემები, რომლის მიხედვითაც Ras ცილები არიან მიტოქონდრიულ კომპარტმენტებში [Rebollo A. et al, 1999]. ვიცით რა, რომ c-N-Ras ქმნის სტაბილურ ანტიაპოფტოზურ სიგნალს, უნდა ვიფიქროთ, რომ მიტოქონდრიაში ლოკალიზებული c-N-Ras ემსახურება უჯრედის გადარჩენის სიგნალს [Wolfman J. C. et al, 2000]. Ras-ის მრავალი ეფექტორი ნაპოვნია მიტოქონდრიულ პრეპარატებში [Peruzzi F. et al, 2001; Kharbanda S. et al, 2000]. ბოლო მონაცემების მიხედვით, თუ ყველა არა, უმრავლესობა c-N-Ras-ისა ლატენტური კომპლექსის სახით Raf-1-თან და პროტეინკინაზა C-თან ერთად არის პლაზმურ მემბრანაში, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ კომპლექსები პასუხობენ MAPK-კასკადს [Hamilton M. et al, 2001.]. მიტოქონდრიულად დაკავშირებული c-N-Ras-ის დანიშნულებას, როგორც ჩანს, უჯრედული აპოფტოზის რეგულაცია წარმოადგენს.

ამრიგად, ყოველი Ras-იზოფორმა განლაგებულია უჯრედული კომპარტმენტების სხვადასხვა ადგილებში. Ras-ის თითოეულ იზოფორმაში ოდნავ განსხვავებულია COOH-ბოლოში არსებული პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციებიც, რაც წარმოქმნის Ras-ცილების ფუნქციურ სხვადასხვაობას. ყველაზე ნათლად ამ სხვაობას მიგვითითებს ის ფაქტი, რომ Ras-ის ყველა იზოფორმა, c-K(B)-Ras-ის გარდა, განიცდის პალმიტირებას. პოლილიზინის ნაშთის თანმიმდევრობაში მიმდინარე პალმიტირება მიმართულებას აძლევს c-K(B)-Ras-ს მემბრანებში გადასაადგილებლად [Chen Z. et al, 2000; James G.L. et al, 1995.]. გარდა ამისა, Ras-ის იზოფორმები განიცდიან ფარნეზილირებას ანუ იზოპრენის ნაშთის ჩართვას ცილოვან მოლეკულაში. ამ ორი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის შედეგად Ras ადჰეზირდება პლაზმურ მემბრანასთან. მემბრანასთან

დაკავშირებული Ras გაცილებით უფრო მაღალ ბიოლოგიურ აქტიურობას ამჟღავნებს, ამიტომ ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორები გადიან კლინიკურ აპრობაციას ზოგიერთი ტიპის დაავადებების თერაპიაში [Overmeyer. J. H. et al, 1998].

Ras ცილები ახორციელებენ თავის ეფექტს უჯრედში ძირითადად სხვადასხვა პროტეინკინაზური კასკადების აქტივაციის გზით. ლიტერატურაში Ras პროტონკოცილის უშუალო დადმავალ ეფექტორებს შორის მეტ წილად მოიხსენიება Raf კინაზები (Raf1, B-Raf და A-Raf), PI-3K (ფოსფატიდილ-3-კინაზა) და RalGDS (გუანიდინის ნუკლეოტიდების დისოციაციის სტიმულატორების) ოჯახის წარმომადგენლები [Burns 1998]. გარდა ამისა, არსებობს გარკვეული მონაცემები იმის შესახებ, რომ Ras პროტონკოცილა მოქმედებს ისეთი მოლეკულების აქტივაციაზე, როგორებიცაა AF-6, Canoe, Rin-1, Nore-1, PKC $\zeta$  და ფოსფოლიპაზა C $\epsilon$  [Takai et al, 2001]. Ras-ის მიერ სიგნალის უჯრედის შიგნით გადაცემა ძირითადად ხდება 3 ტიპის კასკადური გზით: Raf1/MEK/ERK, PI3K/Akt და SAPK/JNK [Wolfman 2002]. ეს უკანასკნელი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს N-Ras-ის აქტივაციით გამოწვეულ სასიგნალო პროცესებში.

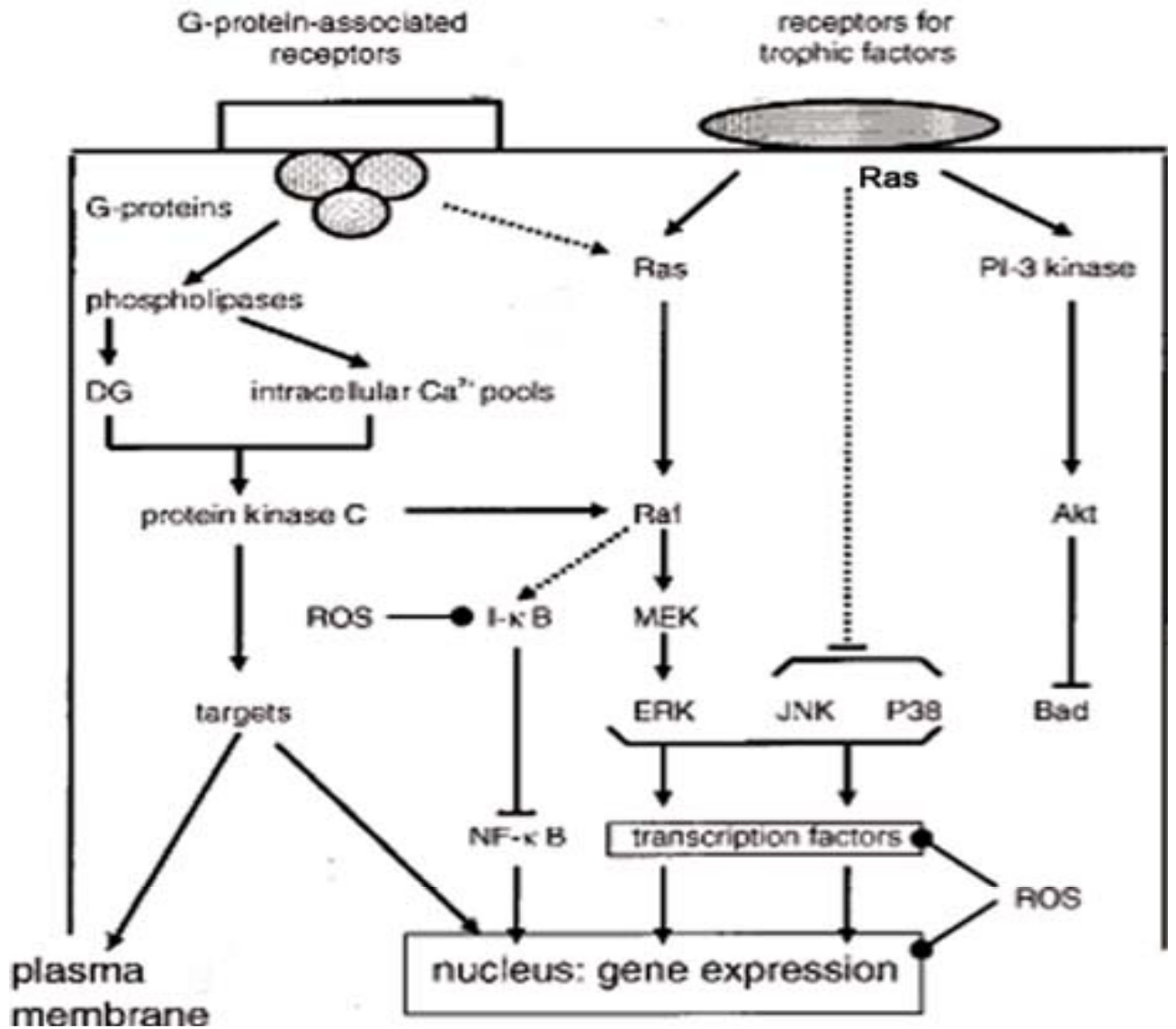
პირველ სასიგნალო გზაში Ras პროტონკოცილის უშუალო ეფექტორს სავარაუდოდ Raf1 (მიტოგენ-აქტივირებული ცილის კინაზის კინაზის კინაზის MAPKKK-ის ანალოგი) წარმოადგენს [Vojtek 1993], რომელიც თავის მხრიდან სერინის და ტრეონინის ფოსფორილებით ააქტივებს MEK ცილას (MAPKK-ის ანალოგი), რაც საბოლოოდ იწვევს ERK (უჯრედგარე პასუხის კინაზის – extracellular response kinase) პროტეინკინაზას (MAPK) აქტივაციას ტრეონინის და თიროზინის ფოსფორილების გზით (სურათი 2).

ERK პროტეინკინაზის დადმავალ ეფექტორებს მიეკუთვნება ზოგიერთი ტრანსკრიპციის ფაქტორი (CREB, Elk-1, c-Myc) და კალიუმის არხი Kv4.2 [Sweatt 2001].

ტრანსკრიპციის ფაქტორებს შორის განსაკუთრებულ ყურადღებას იქცევს CREB (c-AMP response element binding protein), რომელიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს გენების ექსპრესიაზე დამოკიდებული გვიანი ხანგრძლივი პოტენციაციის ინდუქციის რეგულაციაში. CREB ფაქტორის აქტივაცია ხორციელდება 133-ე სერინის



ფოსფორილებით, რომელსაც აკატალიზებს S6 კინაზების pp90rsk ოჯახის წარმომადგენელი RSK2 პროტეინკაზით [Trivier, 1996].



სურათი 2. Ras ცილის დადამავალი ეფექტორები.

რაც შეეხება Kv4.2-ს, იგი წარმოადგენს Shal ტიპის პოტენციალ-დამოკიდებულ K<sup>+</sup>-ის არხს, რომელიც ჭარბად ექსპრესირდება CA1-ის ჰიპოკამპალურ პირამიდულ

ნეირონებში. ეს არხი გადამწყვეტ როლს თამაშობს კალციუმის იონების დინების რეგულაციაში, რის შედეგადაც აუტოფოსფორილებით მიიღება PKC და CaMKII აქტიური ფორმები, რომლებიც სავარაუდოდ იწვევენ NMDA გლუტამატის რეცეპტორის NR2A და NR2B სუბერთეულების თიროზინფოსფორილებას, რაც შერჩევითად ზრდის ამ რეცეპტორის სინაფსურ პასუხს და იწვევს ადრეული LTP-ის პროცესს [Sweatt 2001].

ამგვარად ERK სასიგნალო კასკადი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მრავალი უჯრედული პროცესის რეგულაციაში, მისი აქტივაცია საჭიროა ხანგრძლივი პოტენციაციის და შესაბამისად მეხსიერების ჩამოსაყალიბებლად, ინსულინის მოქმედებით გამოწვეულ თიმიდინის და გლუკოზის მეტაბოლიზმის ცვლილებებში და სხვა.

Ras პროტოონკოცილის მეორე დადმავალ სასიგნალო კასკადს წარმოადგენს PI-3k/Akt გზა, რომლის ამოქმედება იწყება PI-3K (ფოსფატიდილინოზიტოლ-3კინაზას) აქტივაციით და 3-ფოსფო-ინოზიტების წარმოქმნით, რასაც მოჰყვება Akt კინაზის PH დომენის მოდიფიკაცია და პლაზმურ მემბრანასთან მისი დაკავშირება. პლაზმურ მემბრანასთან ასოცირების შემდეგ ხდება Akt-ს ფოსფორილება ორი ფერმენტით: PDK-1, რომელიც აფოსფორილებს 308-ე ან 309-ე ტრეონინს, და PDK2, რომელიც განაპირობებს 473-ე სერინის ფოსფორილებას [Meng 2002].

საინტერესოა, რომ Akt-ს გააქტივება შესაძლებელია Ras-პროტოონკოგენის ექსპრესიით. ცნობილია, რომ Ras-მუტანტებში შეუძლებელია PI3K/Akt-სასიგნალო გზის გააქტივება. ეს მონაცემები საშუალებას იძლევა ვივარაუდოთ, რომ Akt-ს ინჰიბიტორები შეიძლება გამოყენებულ იქნას კლინიკაში, როგორც სიმსივნის საწინააღმდეგო საშუალება [Masure 1999].

Ras პროტოონკოცილის მესამე დადმავალ სასიგნალო გზას მრავალი ლიტერატურული მონაცემით წარმოადგენს JNK კასკადი. JNK (c-Jun N-terminal kinase) მიეკუთვნება სტრესით აქტივირებულ პროტეინკინაზას SAPK (stress-activated proteinkinase) და მონაწილეობს ნერვული უჯრედების დეგენერაციასა და აპოპტოზში. აქტივაციის შემდეგ JNK-ები აფოსფორილებენ მრავალ სუბსტრატს ბირთვში ისეთებს, როგორცაა c-Jun, ATF-2 და ციტოპლაზმაში BCL-2, ნეიროფილამენტებს. JNK ძუძუმწოვრებში წარმოადგენილია 3 იზოფორმით და მისი აქტივაცია ვლინდება c-Jun-ის

ტრანსკრიფციული აქტივობის გაძლიერებაში 63-ე და 73-ე მდგომარეობაში სერინის ნაშთების ფოსფორილირების გზით [Li 2004]. არსებობს მონაცემები, რომ c-N-Ras ახორციელებს თავის ანტიაპოპტოზურ ეფექტს JNK-ს აქტივობის შესუსტების გზით [Wolfman 2002].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე ფრიად საინტერესო ხდება იმ ნატიფი მექანიზმების დაწვრილებითი შესწავლა, რომლებიც ახორციელებენ Ras პროტონკოცილის აქტივაციის რეგულაციას და სხვადასხვა დადმავალი ეფექტორული გზების ჩართვას სიგნალის გადაცემაში უჯრედის შიგნით.

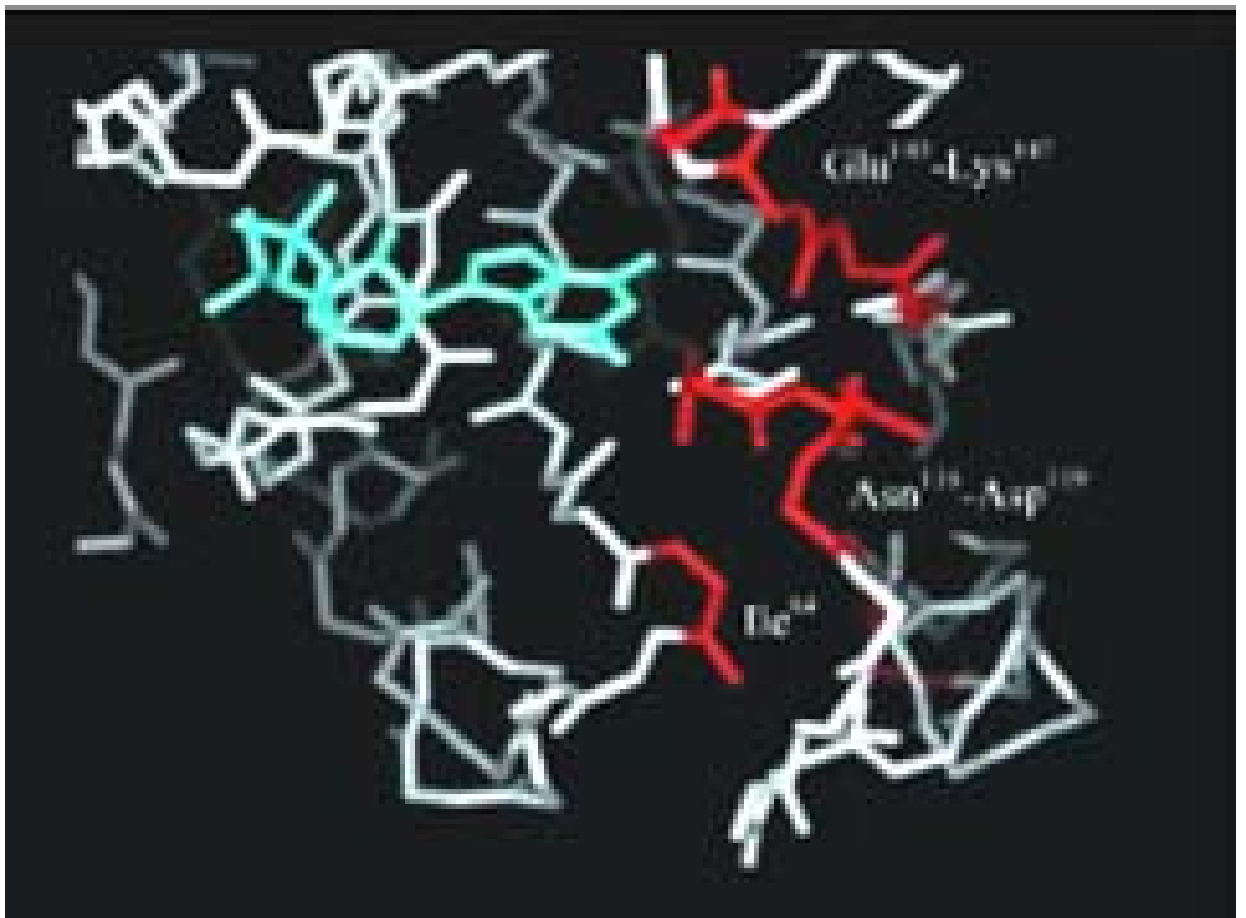
### 1.3. Ras-ის ნიტროზილირება

Ras ცილის რეგულაცია ხორციელდება რიგი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციებით, რომელთა შორის აღსანიშნავია ნიტროზილირება, ფარნეზილირება, პალმიტირება და მეთილირება.

დაახლოებით ოცი წლის წინ აზოტის ოქსიდი (NO) იდენტიფიცირებული იყო, როგორც სისხლძარღვების რელაქსაციური ფაქტორი. აზოტის ოქსიდი ბიომოლეკულებზე თავის ეფექტს ამჟღავნებს იმ ნაშთების პირდაპირი მოდიფიკაციით, რომლებიც მნიშვნელოვანია ცილის სტრუქტურისთვის ან ფერმენტული კატალიზისთვის. Ras-ცილა წარმოადგენს ყველაზე ხშირად მუტირებადი ონკოგენის ცილოვან პროდუქტს და NO-ს მიერ S-ნიტროზილირების ერთ-ერთ სამიზნედ ითვლება. როგორც უკვე ავღნიშნეთ, ონკოგენურ ფორმაში Ras GTP-დაკავშირებულ მდგომარეობაში იმყოფება და მუდმივად აქტიურია. Ras მოდიფიცირება NO-თი გამოიწვევა *in vivo* [Lander H. M. et al, 1995; Lander H. M. et al, 1998; Yun H. M. et al, 1998]. პირველად ლანდერმა [Lander H. M. et al, 1995] აჩვენა, რომ ადამიანის T-ლიმფოციტების NO-თი დამუშავება იწვევდა GTP-დაკავშირებულ Ras ფორმის პროცენტულ ზრდას. *in vitro* ექსპერიმენტებში ნანახია, რომ Ras პროტონკოცილა უფრო სწრაფად ცვლის გუანინდინურ ნუკლეოტიდებს NO-ს თანაობისას [Lander H. M. et al, 1995]. მოგვიანებით აღმოჩნდა, რომ Ras-ცილის Cys-118 ნაშთი მოდიფიცირდება NO-თი. ნაჩვენებია, რომ ეს მოდიფიცირება მონაწილეობს Ras პროტონკოცილის მიერ გუანინდინის

ნუკლეოტიდების ცვლის რეგულაციაში და აუცილებელია გადარჩენის სიგნალის აღძვრისთვის ნეირონულ PC12 უჯრედებში [Teng 1999]. რადგანაც 118-ე ცისტეინის ნაშთები განლაგებული არიან იმ მარყუჟზე, რომლებიც გუანიდინური ნუკლეოტიდებს იკავშირებენ, ნავარაუდევია იყო, რომ ცისტეინის ეს მოდიფიკაცია უშუალოდ მოქმედებს Ras-ცილის GTP/GDP-ის ფარდობაზე და ამგვარად ცვლის მის აქტივობას [Pai E. F. et al, 1990]. Ras-ცილას, 118-ე ცისტეინის გარდა აქვს ცისტეინის სამი სხვა ნაშთი, რომლებიც აგრეთვე შეიძლება მოდიფიცირდეს *in vivo* (სურათი 3). რომელიმე ამ სხვა ცისტეინის მოდიფიკაციამ შეიძლება ხელი შეუშალოს Ras-ის აქტივაციას 118-ე ცისტეინის მოდიფიცირების გზით, რადგანაც სხვა ცისტეინები მონაწილეობენ ცილის მემბრანაში ლოკალიზაციაში. ასე მაგალითად, Cys-181 და Cys-184 პალმიტირდებიან *in vivo* [Hancock J. F. et al, 1998; Willumes B. M. et al, 1996] და ყველაზე C-ტერმინალური Cys-186 ფარნეზილირდება [Hancock J. F. et al, 1998; Garcia A.M. et al, 1993; Kohl N. E. et al, 1993; James, G. L. et al, 1993].

აღსანიშნავია, რომ ნიტროზილირებას განიცდის, როგორც ციტოზოლური, ასევე უკვე მოდიფიცირებული, მემბრანასთან ასოცირებული მოლეკულა. ამჟამად *in vivo* აღმოჩენილია, რომ H-Ras-ზე პალმიტატები განიცდიან მნიშვნელოვან მეტაბოლურ ცვლას და ეს ცვლა ძლიერდება ნიტროზული სტრესის პირობებში [Baker 2000].



**სურათი 3. Ras ცილის მოლეკულის ნიტროზილირება (წითლად).**

გარდა ამისა ნანახია, რომ NO და NO-ს წარმომქმნელი ოქსიდანტები ნერვულ უჯრედში იცავენ ზოგიერთ ცილას პალმიტირებისაგან [Hess 1993]. ეს ეფექტი შეიძლება ახსნილი იყოს Cys-181, Cys-184, Cys-186 ისეთი ნიტროზული აგენტებით პირდაპირი მოდიფიკაციის შედეგით, რომელიც ჩართულია პალმიტატების მეტაბოლიზმში (მაგალითად S-ნიტროზოცისტეინი).

უჯრედში თავისუფალი აღდგენილი გლუტათიონის სიჭარბის გამო, ნებისმიერი მექანიზმი, რომელშიც ნავარაუდევია, რომ ცილა S-ნიტროზილირდება, შეიძლება აგრეთვე მივაწეროთ გლუტათიონის მონაწილეობას ოქსიდაციურ პროცესებში [Thomas 1995]. ამჟამად ნაჩვენებია, რომ S-ნიტროზოცისტეინი აწარმოებს ცილების მთლიანი თიოლების უფრო მნიშვნელოვან S-ნიტროზილირებას, ვიდრე S-გლუტათიოლირებას და S-ცისტეითილირებას [Mallis 2000]. ცილებზე სხვადასხვა უბნები ამჟღავნებენ საკმაოდ განსხვავებულ ოქსიდანტების მიმართ რეაქტიულობას. ამის მსგავსად

სხვადასხვა ოქსიდაციურ ადუქტებს შეუძლიათ სხვადასხვა ეფექტის გამოწვევა, რაც დამოკიდებულია ზომაზე და მუხტზე.

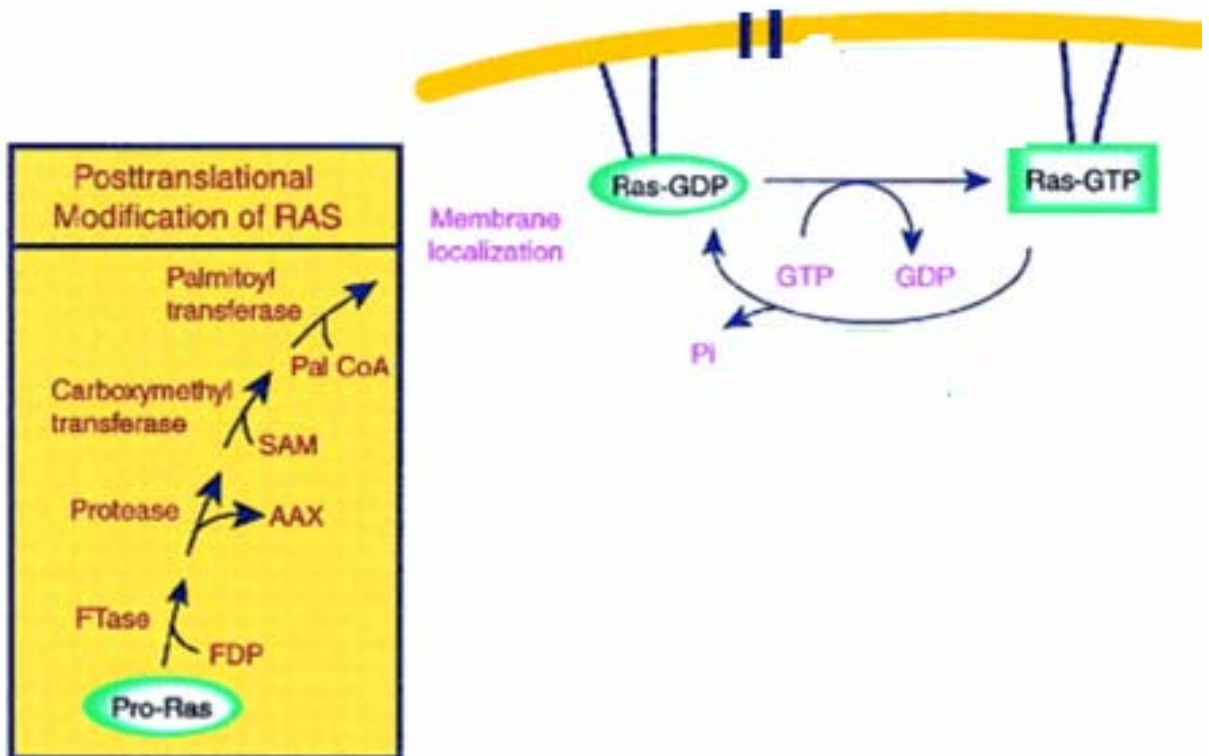
#### *1.4 Ras-ის ფარნეზილირება*

აღსანიშნავია, რომ Ras ცილის გააქტიურებისათვის და მისი ეფექტურობის ასამაღლებლად მოლეკულა უნდა დაუკავშირდეს მემბრანის შიდა მხარეს. მემბრანასთან დაკავშირება განპირობებულია ერთ-ერთი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციით, რომელსაც ფერმენტი ფარნეზილტრანსფერაზა (FT-აზა) ახორციელებს. ფარნეზილტრანსფერაზა წარმოადგენს უჯრედებში ფართოდ გავრცელებულ ფერმენტს, რომელიც აკატალიზებს ფარნეზილის ჯგუფის დაკავშირებას Ras-თან [Moore S.A. L. 1991; Zhang F.L. 1996]. ამ რეაქციაში ფარნეზილის ჯგუფის დონორს ფარნეზილპიროფოსფატი წარმოადგენს. ფერმენტის მოლეკულა შედგება ორი სუბერთეულისაგან:  $\alpha$  და  $\beta$  სუბერთეული.

ახლად ფარნეზილირებული Ras ტრანსლოცირდება პლაზმურ მემბრანაში, სადაც ის შეიძლება გააქტივდეს GTP-ით ზრდის ფაქტორების საპასუხოდ [Leitner J. W. 1977; Goalstone M. L. 1998; Goalstone M. 1997]. ამგვარად, Ras-ის აქტივაციის ხარისხის ერთ-ერთ სარეგულაციო გზას წარმოადგენს ფარნეზილტრანსფერაზა. მაგალითად, ლიტერატურაში არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ერთ-ერთი მთავარი მეტაბოლური ჰორმონი და სუსტი მიტოგენი ინსულინი აძლიერებს სხვა ზრდის ფაქტორების უნარს გააქტივოს Ras [Leitner J. W. 1977; Goalstone M. L. 1998]. ინსულინის მოქმედების ეს ასპექტი აიხსნება მისი სტიმულატორული ეფექტით ფარნეზილტრანსფერაზას აქტივობაზე [Goalstone M. L. 1996], რადგანაც ეს ეფექტი მთლიანად ბლოკირდება FT-აზას ინჰიბიტორებით [Leitner J. W. 1977; Goalstone M. L. 1998; Goalstone M. L. 1996; Vogt A. 1995]. სავარაუდოდ, ინსულინი ზრდის MAP კინაზის აქტივობას [Olefsky J. M. 1990; Cheatham B. 1995]. ეს უკანასკნელი იწვევს ფარნეზილტრანსფერაზას ფოსფორილირებას და აქტივაციას [Marc L. 1998].

ფარნეზილირება ხდება Ras ცილის C-ბოლოს CAAX-ნაწილში. CAAX-ში 186-ე ცისტეინი პირველად ფარნეზილირდება იზოპრენის ნაშთის დამატების საშუალებით.

ამას შემდეგ მოსდევს პროტეოლიზური სამი AAX- ამინომჟავის ამოჭრა C-ბოლოში. ფარნეზილირებული ცილა განიცდის სხვა მოდიფიკაციასაც. როგორც კი AAX ჩამოცილდება ცილის მოლეკულას, 186-ცისტეინი განიცდის მეთილირებას მეთილტრანსფერაზით (MT), იგი ტრანსლოცირდება პლაზმურ მემბრანაზე და განიცდის შემდგომ პალმიტირებას ცისტეინის აღმავალ ნაშთებზე (სურათი 4), სავარაუდოდ ეს მოდიფიკაცია მონაწილეობს უჯრედის პროლიფერაციასა და რადგანაც ცისტეინის პალმიტირება მოიცავს თიოესთერული ბმის წარმოქმნას, შესაძლებელია მოხდეს თიოლით გაშუალებული მოდიფიკაცია ისეთ დაბალმოლეკულურ თიოლებთან, რიგორც არის გლუტათიონი, უბრალო გაცვლის გზით. მეორე მხრივ, ფარნეზილის ნაშთი უკავშირდება უფრო ინერტული თიოეთერით და როგორც ჩანს H-Ras-ის 10-დან 5%-მდე არ არის მემბრანასთან დაკავშირებული [Willumsen 1996].



სურათი 4. Ras ცილის ფარნეზილირება და მემბრანაში ტრანსლოკაცია

1.5. Ras-ცილის ტრანსფორმაცია

Ras პროტონკოცილის ფუნქცია განსაკუთრებით საინტერესოა, თუ გავითვალისწინებთ, რომ ავთვისებიან სიმსივნეთა უჯრედთა უმრავლესობაში წარმოდგენილია *ras* გენის წერტილოვანი მუტაცია. დამტკიცებულია, რომ წერტილოვანი მუტაციები, რომლებიც იწვევენ *ras* გენის აქტივაციას, ყოველდღე ადამიანში სპონტანურად ხდება საშუალოდ ათასობით უჯრედში [Paul 1986]. ამ მოვლენების უმრავლესობას არ მოჰყვება არანაირი ცვლილებები, მაგალითად სიმსივნის განვითარება, და შესაძლებელია გამოსახოს უჯრედის სიკვდილში, დიფერენცირებასა ან ზრდის შეჩერებაში. რა ხდება იმ შედარებით იშვიათ შემთხვევებში, როდესაც *ras*-ის აქტივაციას მოჰყვება არაკონტროლირებადი ზრდა? შესაძლოა, რომ ასეთ მუტაციებს ადგილი აქვს სამიზნე (ალბათ ღეროვანი) უჯრედების მცირე პოპულაციებში, რომელიც პროგრამირებულია პოზიტიურად უპასუხოს *ras* სიგნალით ზრდის აქტივაციას. ან პირიქით, ეს დამატებითი გენეტიკური მოვლენები საჭიროა *Ras* აქტივაციის ნეგატიური ეფექტის მოსახსნელად. კიდევ ერთი სავარაუდო მექანიზმი არის ის, რომ ეპიგენეტიკურმა სტიმულებმა (მაგალითად, სიმსივნის პრომოტორებმა) შეიძლება გადაარჩინონ ის უჯრედები, რომლებშიც მოხდა მუტაცია ზრდის შეჩერების ან სიკვდილის სიგნალის შეცვლით უშუალო გაყოფაზე ან გადარჩენაზე.

ამრიგად, *Ras*-ის ოჯახი წარმოადგენს პროტონკოგენების ძირითად კლასს, რომელშიც წერტილოვანი მუტაცია არის აღმოჩენილი. ეს გენები არიან ძალიან მგრძობიარენი კანცეროგენული ნაერთების მიმართ და ერთი კოდონის შეცვლაც კი ნეოპლაზიურ გადაგვარებას იწვევს. ამიტომ სხვადასხვა ტიპის სიმსივნეებში მუტაცია შესაძლებელია სხვადასხვა ამინომჟავებს შეეხოს. მაგალითად, თუ შარდის ბუშტის კარცინომებში ადგილი აქვს c-H-Ras-ის მე-12 კოდონში ცვლილებას, რის გამოც გლიცინი ვალინით ინაცვლებს, ფილტვის კარცინომების შემთხვევაში - იგივე კოდონში გლიცინის ნაცვლად გვხვდება ლიზინი, ხოლო ნეირობლასტომებში - 61 კოდონის წერტილოვანი მუტაცია იწვევს გლუტამინის მჟავის ლიზინით შეცვლას. ასეთი ტიპის მუტაციები *Ras*-ში მისი ცილოვანი პროდუქტების კონფორმაციულ ცვლილებებს განაპირობებენ, რის გამოც ის ზეაქტიური ხდება და Raf-ის კასკადის ინტენსიური მიმდინარეობის შედეგად ზრდის უჯრედის მიტოზურ ინდექსს. *Ras*-ის ალელი



მგრძობიარეა აგრეთვე სხვადასხვა ტიპის გენეტიკური ცვლილებების და რეარანჟირების მიმართ და ამიტომ მისი ექსპრესია მრავალი ტიპის ონკოლოგიური გადაგვარებისას ხდება. Ras-ის ტრანსფორმაცია ხშირად სხვა ონკოგენის აქტივაციას მოყვება.

c-H-Ras და c-K-Ras აქტივირდებიან ეპითელიური ქსოვილის კიბოს შემთხვევაში, ხოლო c-N-Ras-ის ექსპრესია უპირატესად ჰემატოპოეზური უჯრედების ნეოპლაზიისას წარმოებს. მწვავე ლეიკემიების დროს ras-ონკოგენის სამივე ფორმა აქტივირდება.

Ras-ის ექსპრესია მრავალნაირი ნეოპლაზიების დროს მჟღავნდება, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ ეს ონკოგენი მგრძობიარეა ყოველი ტიპის გენეტიკური რეარანჟირების მიმართ. მისი ზეაქტივობა ხშირად მეორად ხასიათს ატარებს და ინდუცირებულია სხვა ონკოგენის მიერ. ამიტომ, თუ ისეთი ტიპის სიმსივნეებში, როგორც არის პანკრეასის კარცინომა, Ras-ის აქტივაცია გვხვდება 90% შემთხვევებში, მსხვილი ნაწლავისა და ფარისებური ჯირკვლის ადენოკარცინომების დროს 50-60% შემთხვევებში, მელანომების, შარდის ბუშტის კარცინომის, ლეიკემიების დროს მისი ზეექსპრესია მხოლოდ 5-20% შემთხვევებშია ნანახი.

ამრიგად, წერტილოვანი მუტაციის მქონე ras-ონკოგენები აკოდირებენ მუდმივად აქტიურ Ras ცილებს, რომლებიც არღვევენ ბალანსს უჯრედის ზრდასა და პროგრამირებად სიკვდილს შორის უჯრედული ზრდისათვის უპირატესობის მინიჭებით. ასეთი გზით Ras ონკოცილებს შეუძლიათ კანცეროგენუზის გამოწვევა. ზრდის ფაქტორების დაკავშირება მათ რეცეპტორებთან ჩართავს ცილოვანი ურთიერთობების კასკადს, Ras ცილების აქტივაციის ჩათვლით. თავის მხრივ Ras ცილებს მოძრაობაში მოჰყავთ უჯრედის დაყოფის მანქანა სხვადასხვა ეფექტორული ცილების სტიმულაციით, რომლებიც არეგულირებენ მორფოლოგიურ ცვლილებებს, საკვების მოთხოვნილებას და იმ გენების ექსპრესიის ცვლილებას, რომლებიც საჭიროა უჯრედული დაყოფისათვის. Ras ონკოცილების არსებობა მუდმივად ასტიმულირებს პროლიფერაციას, როდესაც ამავე დროს აპოპტოზური გზა არის სუპრესირებული და იკარგება უჯრედული ციკლის რეგულაცია [deVries J.E. 1996].

როგორც ჩანს, ტრანსფორმირებული Ras მონაწილეობას იღებს მხოლოდ ტრანსფორმაციის ინიციატიაში და სიმსივნური პროცესის ჩამოყალიბებას არ

განაპირობებს. Ras-ის ძლიერი ექსპრესია კიბოს განვითარების ადრეულ სტადიებზე წარმოებს, ხოლო პირველადი სიმსივნის ფორმირებისას და მით უმეტეს მეტასტაზირების პროცესში – მცირდება. Ras-ის ექსპრესიის ასეთი დინამიკა გამოხატულია მიელოდისპლაზიისა და მწვავე ლეიკემიის შემთხვევაში. ეს იმაზე მეტყველებს, რომ Ras-ის მუტაცია ნეოპლაზიური მუტაციის ინიციაციის სტადიას განაპირობებს და არ მონაწილეობს მისი ფორმირების პროცესში. აღსანიშნავია ისიც, რომ მხოლოდ Ras-ის მუტაცია არ არის საკმარისი უჯრედის გადაგვარებისათვის და იმისათვის, რომ ნეოპლაზია განვითარდეს, აუცილებელია სხვა ონკოგენების (მაგალითად, Myc, Fos და ა.შ.) აქტივაციაც. Ras-ის ცილოვანი პროდუქტი უჯრედში მიტოზური რეაქციების დაწყებას განაპირობებს და მისი მოქმედების საბოლოო მიზანს, ბირთვში არსებული რეპლიკაციური სისტემა წარმოადგენს. ამ უკანასკნელის ძირითად და წამყვან კომპონენტს ანტი-ონკოგენების p53 და Rb-ცილოვანი პროდუქტები შეადგენენ, რომელთა ელიმინაციაც აუცილებელია ტრანსფორმაციის პროცესის დასაწყებად. ამიტომ, Ras-ის მუტაციამ და მისმა სუპერაქტივაციამ ონკოგენების ინიციაცია შესაძლებელია დაიწყოს მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ პარალელურად მოხდა ბირთვული ონკოცილების - ტრანსკრიფციის ფაქტორების გაძლიერებული პროდუქცია ან ანტი-ონკოცილების სუპრესია – დათრგუნვა.

ამრიგად, Ras და მისი კასკადი უჯრედის ერთ-ერთ მთავარ რეგულაციურ სისტემას წარმოადგენს, რადგან მისი აქტივაცია უჯრედის ფუნდამენტურ ცვლილებებთან არის დაკავშირებული. მას უჯრედი ინტერფაზიდან მიტოზში გადაჰყავს. პროცესი დამოკიდებულია ზემოლეკულურ რეცეპტორულ კომპლექსში შემავალ ცილათა კონცენტრაციაზე, რომელთა სინთეზიც თავის მხრივ გენეტიკური კონტროლის ქვეშ იმყოფება. ასეთი რთული რეგულაცია გამორიცხავს Ras-ის კასკადში მიმდინარე პროცესების შემთხვევით ხასიათს, რადგან იგი განპირობებულია ცილების კონცენტრაციით და მათი რაობით. ეს თვისება დამახასიათებელია არა მარტო Ras-ის კომპლექსისათვის, არამედ რთული სისტემებისათვისაც, რომლებიც უჯრედის ძირეულ თვისობრივ მხარეს აკონტროლებენ.

Ras-ის ეფექტები უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობასა და აპოპტოზზე შესაძლოა წარიმართოს სიგნალის გადაცემის სხვადასხვა გზით. სიგნალის გადაცემა Raf / MEK /

ERK გზით ზოგ შემთხვევაში არის პროაპოპტოზური, თუმცა, აგრეთვე დადგინდა, რომ Ras / Raf / MEK /ERK\_ გზა ფუნქციონირებს როგორც აპოპტოზის ხელისშემშლელი. უახლესმა მონაცემებმა აჩვენა, რომ Raf-1-ის დამატებით ფუნქციებს წარმოადგენს MEK და ERK-საგან დამოუკიდებლად მისი მონაწილეობა აპოპტოზის ინდუქციის საწინააღმდეგოდ. აგრეთვე დადგენილია Ras-ის ფუნქცია PI3-კინაზა /Akt სასიგნალო გზების მეშვეობით. Akt ხელს უწყობს უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობას ნაწილობრივ ფოსფორილირებით და ნაწილობრივ პროაპოპტოზური Bad-ის და კასპაზა-9-ის ინაქტივაციით. ზოგ შემთხვევაში კი უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის ხელის შეწყობა მიმდინარეობს ორივე, Raf / MEK / ERK და PI3-კინაზური გზებით [Wolfman C. 2002].

PI3-K და MAPK-ი აძლიერებენ ორ განსხვავებულ სასიგნალო კასკადს ნერვულ უჯრედებში. MAPK გზა რამდენიმე ფოსფორილირების ეტაპის საშუალებით გადასცემს სიგნალებს, რომლებიც იწყება პლაზმურ მემბრანაში არსებული ნერვების ზრდის ფაქტორის (NGF) რეცეპტორებიდან და მთავრდება ტრანსკრიფციის ფაქტორებზე ბირთვში. აქტივირებული ტრანსკრიფციის ფაქტორები საჭირონი არიან გვიანი და ადრეული გენების ექსპრესიაში.

## 2. უჯრედშიდა სიგნალის გადაცემაში მონაწილე პროტეინკინაზები

### 1.1 ERK პროტეინკინაზა

ERK წარმოადგენს p44/42 MAP-კინაზას, რომელიც ჩართულია ჰიპოკამპის სინაპსურ პლასტიკურობაში, დასწავლასა და მეხსიერების პროცესებში. ძუძუმწოვრებში აღმოჩენილია ERK-ის ორი იზოფორმა: ERK1(p44MAPK) და ERK2(p42MAPK), რომლებიც ჭარბად ექსპრესირდება ზრდასრული ორგანიზმის ცენტრალური ნერვული სისტემის ნეირონებში და მისი გააქტივება ძირითადად უკავშირდება უჯრედების პროგრამირებულ სიკვდილს. მაგრამ არსებობს გარკვეული ლიტერატურული მონაცემები ამ კასკადის ანტიაპოპტოზური მოქმედების შესახებ. ამ გზის ამოქმედება უმრავლეს შემთხვევაში ხდება ზრდის ფაქტორების (მათ შორის ინსულინის) და

სიმსივნის პრომოტორების სიგნალის საპასუხოდ და სიგნალი შესაბამისი რეცეპტორებიდან Ras პროტონკოცილაზე და ERK პროტეინკინაზურ კასკადზე ხორციელდება სხვადასხვა ადაპტორული ცილებით (ინსულინის შემთხვევაში GRF ან SOS ფაქტორებით) [Draznin 1993] და საჭიროებს ფარნეზილირებული Ras ცილის მონაწილეობას [Reusch 1995].

MAP-კინაზები სიგნალს გადასცემენ უჯრედის ზედაპირიდან ბირთვისაკენ, ტრანსკრიფციის ფაქტორების გააქტივების და მათი უჯრედშიდა ლოკალიზაციის შეცვლის გზით [Hoshi M. 1988]. ERK-ს კასკადი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ხანგრძლივი პოტენციაციის მოდულაციაში და როგორც ითქვა აუცილებელია დასწავლისა და მეხსიერების ზოგიერთი ფორმისათვის. [Maginn Elaina 2001]. უკანასკნელი მონაცემებით დადგინდა, რომ ERK-ს სასიგნალო კასკადი მონაწილეობს სინაპსური ტრანსმისიის ზოგიერთ სხვა ასპექტშიც. ERK წარმოადგენს ციტოპლაზმური პროტეინკინაზური კასკადის კომპონენტს და Ras-ERK-გზა აუცილებელია ნერვული ზრდის ფაქტორის (GNF) სიგნალის გადაცემისთვის. ERK-კასკადი ძირითადად შედგება სამი კინაზისაგან: MAPKKK, ERK-1, ERK-2. MAPKKK სიგნალს გადასცემს MAPKK-ს, ხოლო ეს უკანასკნელი კი ააქტივებს ან ERK-1 (MAPKp44) ან ERK-2 (MAPKp42). თავის მხრივ MAP-კინაზები და მათ შორის ERK აქტივდებიან ფოსფორილირებით, ხოლო ERK-ს გააქტივება უპირატესად დაკავშირებულია უჯრედების პროგრამირებულ სიკვდილთან. ERK-პროტეინკინაზები ფოსფორილირდებიან ზრდის ფაქტორებისა და სიმსივნის პრომოტორების საპასუხოდ და აკონტროლებენ უჯრედული ციკლის პროგრესიას [Hoshi M 1988]. ERK-ს გააქტივება ხდება შიშის მდგომარეობის დროს, რამაც შეიძლება გამოიწვიოს რამოდენიმე ტრანსკრიფციული ფაქტორის გააქტივება, მათ შორის CREB, Elk-1 და c-Myc [Treisma R 1996].

## ***2.2 AAkt პროტეინკინაზა.***

Akt- პროტეინკინაზა წარმოადგენს პროტეინკინაზა-B, აგრეთვე მას უწოდენ RAC-პროტეინკინაზას. არსებობს Akt-ს სამი იზოფორმა: Akt-1, Akt-2 და Akt-3. მისი აქტივაციის ეფექტი ძირითადად ვლინდება ისეთი პროაპოპტოზური მოლეკულების

ფოსფორილებასა და ინაქტივირებაში, როგორებიცაა გლიკოგენ სინთაზის კინაზა3, Bad, Forkhead ოჯახის ტრანსკრიფციის ფაქტორები და პროკასპაზა-9 [Meng 2002].

მნიშვნელოვანია ის ფაქტი, რომ Akt-ს შეუძლია აპოპტოზის ინჰიბირება. თავის მხრის Akt-ს გააქტივება შესაძლებელია ras-პროტოონკოგენის ექსპრესიით. ცნობილია, რომ ras-მუტანტებში შეუძლებელია PI3K/Akt-სასიგნალო გზის გააქტივება. Akt-პროტეინკინაზა იწვევს სხვადასხვა ტრანსკრიფციული ფაქტორების ფოსფორილირებას. ლიტერატურული მონაცემებით დადასტურებულია, რომ ტრანსკრიფციული ფაქტორი NF-kB და Akt-სასიგნალო გზა კონვერგირებს. მართლაც IκB-კინაზა, რომელიც ჩართულია NF-kB-ს გააქტივებაში, წარმოადგენს Akt-ს სუბსტრატს [Bing-Chang Chen 2002].

ამრიგად, Akt-ს გააქტივება ასტიმულირებს NF-kB-ს ტრანსლოკაციას ბირთვში. სერინტრეონინკინაზა Akt და NF-kB ტრანსკრიფციული ფაქტორი ჩართულები არიან უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის გაზრდაში [Meng F. 2002].

ეს მონაცემები საშუალებას იძლევა ვივარაუდოთ, რომ Akt-ს ინჰიბიტორები შეიძლება გამოყენებულ იქნას კლინიკაში, როგორც სიმსივნის საწინააღმდეგო საშუალება [Masure S. 1999].

### **2.3 JNK პროტეინკინაზა**

c-Jun N-ტერმინალური კინაზები (JNK) მიეკუთვნება სტრესით აქტივირებულ პროტეინკინაზას SAPK (stress-activated proteinkinase) და მონაწილეობს ნერვული უჯრედების დეგენერაციასა და აპოპტოზში. აქტივაციის შემდეგ JNK-ები აფოსფორილებენ მრავალ სუბსტრატს ბირთვში, ისეთებს როგორიცაა c-Jun, ATF-2 და ციტოპლაზმაში BCL-2, ნეიროფილამენტები. JNK ძუძუმწოვრებში წარმოდგენილია სამი იზოფორმით და მისი აქტივაცია ვლინდება c-Jun-ის ტრანსკრიფციული აქტივობის გაძლიერებაში. JNK-ები აძლიერებენ c-Jun-ის ტრანსკრიფციულ აქტივობას 63 და 73 მდგომარეობაში სერინის ნაშთების ფოსფორილირების გზით. JNK და c-Jun შეუძლია აპოპტოზის მართვა. NO-დამოკიდებული ფოსფორილირების ჩართვა უჯრედულ აპოპტოზში არ აღინიშნება. ეს მნიშვნელოვანია, რადგან ზედმეტი NO იწვევს უჯრედის

სიკვდილს ტვინში ტრამვის, ინსულტის და ნეიროდეგრადაციის შემთხვევებში. NO აინდუცირებს აპოპტოზს JNK-ს აქტივაციის და c-Jun გზის ser-63-ზე ფოსფორილირების შემდეგ [Li L. 2004].

არსებობს მონაცემები, რომ c-N-Ras ახორციელებს თავის ანტი-აპოპტოზურ ეფექტს JNK-ს აქტივობის შესუსტების გზით [Wolfman 2002].

JNK-ს აქტივაცია ძირითადად ხდება ანთებითი ციტოკინების და ზოგიერთი ნეიროტროპული ფაქტორის საპასუხოდ, და ეს ეფექტი სავარაუდოდ ინსულინით და ინსულინის მაგვარი ზრდის ფაქტორებით ინჰიბირდება [Okubo 1998]. აგრეთვე ნაჩვენებია, რომ აზოტის ოქსიდის ჭარბი ექსპრესია მონაწილეობს JNK-ის აქტივაციით გაშუალებულ აპოპტოზის პროცესებში [Yamagishi 2003]. JNK-ს აქტივობის შესუსტების გზით, c-N-Ras იცავს უჯრედს აპოპტოზისაგან.

ნეიროტროპული რეცეპტორი p75 ააქტივებს Rac-GTPase-ას, რაც თავის მხრივ ააქტივებს JNK-ს NGF-დამოკიდებული გზით. ეს აქტივაცია საჭიროა p75-ით გაშუალებული აპოპტოზისათვის. p75-ის აპოპტოზური მანქანა თავის თავში აერთიანებს Rac-GTP-ასა და JNK-ს [Saya Nakagomi 2003].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე ფრიად საინტერესო ხდება იმ ნატიფი მოლეკულური მექანიზმების დაწვრილებითი შესწავლა, რომლებიც ახორციელებენ Ras პროტონოცილის აქტივაციის რეგულაციას და სიგნალის გადაცემის პროცესში სხვადასხვა დადმავალი ეფექტორული გზების ჩართვას უჯრედის შიგნით.

## 2. ტრანსკრიფციის ფაქტორები

დღეისათვის მრავალი ტრანსკრიფციის ფაქტორი არის აღმოჩენილი. ისინი ძირითადად დაბალმოლეკულურ ცილებს წარმოადგენენ და მათი რაოდენობა ბირთვში უჯრედის ფუნქციური მდგომარეობის ცვლილებებთან არის დაკავშირებული. ჰორმონალური გაღიზიანების თუ გარკვეული ზემოქმედებების შედეგად ტრანსკრიფციის ფაქტორების რაოდენობა ბირთვში იზრდება.

ტრანსკრიფციის ფაქტორები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ გენების ტრანსკრიფციაში და ისინი აუცილებელი არიან პრომოტორში რნმ-ის სინთეზის

ინიციატივისათვის. მათთვის დამახასიათებელია ჰომო- ან ჰეტეროდიმერებად გაერთიანება. დიმერების წარმოქმნა ცილოვანი მოლეკულის სპეციალიზირებული უბნების საშუალებით ხდება. ამ უბნებით ტრანსკრიფციის ფაქტორები ერთმანეთს უკავშირდებიან. ამ კავშირებიდან ყველაზე გავრცელებულს ე. წ. ლეიცილის “ელვა” წარმოადგენს. ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს, რომლებსაც ლეიცილით მდიდარი უბნები გააჩნიათ, ერთმანეთს ჰიდროფობული ურთიერთობით უკავშირდებიან შესაკრავი “ელვის” პრინციპით. ტრანსკრიფციული ფაქტორები შეიცავენ ორ დომენს: დნმ-დაკავშირებად დომენს და აქტივირებად დომენს. დნმ-დაკავშირებადი დომენები შედგებიან ან დადებითად დამუხტული ამინომჟავებისაგან ან ამინომჟავებისაგან, რომლებიც კოორდინაციული ბმით იკავშირებენ ორვალენტთან მეტალებს. უკანასკნელ შემთხვევაში ასეთ ორვალენტთან მეტალებს ხშირად თუთია წარმოადგენს (ე. წ. “თუთიის თითები”).

ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობა შეიძლება კონტროლირდებოდეს დნმ-თან დაკავშირების თვისებით უჯრედგარე სიგნალების საპასუხოდ. კონტროლის ერთ-ერთი გზაა ფოსფორილირება, რომელიც მოქმედებს დნმ-თან დაკავშირების თვისობაზე, ტრანსკრიფციულ აქტივობაზე და სუბუჯრედულ ლოკალიზაციაზე. არსებობს სხვადასხვა სახის ტრანსკრიფციული ფაქტორი. ჩვენ განვიხილავთ რამოდენიმე მათგანს.

### 3.1 STAT

STAT-ის ოჯახის ტრანსკრიფციის ფაქტორები მონაწილეობენ სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში, როგორც არის სხვადასხვა გენების ექსპრესიის რეგულირება ემბრიოგენეზში, უჯრედული ზრდის დროს და ა.შ. [Alister c. 2000]. ძუძუმწოვრებში აღმოჩენილია STAT-ის მაკოდირებელი შვიდი გენი, რომლებიც პასუხისმგებელი არიან სხვადასხვა იზოფორმების სინთეზზე. STAT-ის გააქტივება ხორციელდება მისი ფოსფორილირების გზით JAK-პროტეინკინაზას საშუალებით. ფოსფორილირება ხორციელდება STAT-ის მე-700 მდგომარეობაში არსებულ თიროზინის ნაშთზე [Darnell J. E. 1997]. ნორმაში ციტოპლაზმაში არსებული STAT ფაქტორები ფოსფორილირების შემდეგ ქმნიან დიმერებს, რომლებიც თავის მხრივ დამოკიდებულნი არიან

ფოსფოთიროზინის შემცველ რეცეპტორის და SH2-დომენის შემცველი ცილის ურთიერთქმედებაზე [Schinder C. 1995]. გააქტივებული STAT ფაქტორები ტრანსლოცირდებიან ბირთვში, სადაც უკავშირდებიან შესაბამის დნმ-ის თანმიმდევრობას და ასოცირდებიან სხვა ტრანსკრიფციის აქტივატორებთან შესაბამისი გენების ტრანსკრიფციის შესასრულებლად. ერთ-ერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორის NF-kB-ს აქტივაციის მსგავსად, STAT-ის აქტივაციაც არის წამიერი, რაც ადასტურებს იმას, რომ STAT ფაქტორები ან დეფოსფორილირდებიან თიროზინფოსფატაზათი ან იშლებიან. JAK/ STAT სასიგნალო გზა სპეციფიკურია. JAK-ები მნიშვნელოვანი არიან ნორმალური იმუნური პასუხის ფიზიოლოგიაში; მათი რეგულაციის დარღვევა, სავარაუდოდ იწვევს კანცეროგენეზს, რადგან STAT- ფაქტორები ძირითადად განაპირობებენ ანთებითი ციტოკინების გენების ექსპრესიას.

### 3.2 Sp1

ნეირონული უჯრედის სიკვდილმა ოქსიდაციური სტრესის საპასუხოდ შეიძლება გამოიწვიოს შინაგანი ადაპტაციური მექანიზმების უკმარისობა – მოშლა. Sp1 წარმოადგენს თუთიის თითების შემცველ ტრანსკრიფციის ფაქტორს, რომელიც ოქსიდაციური სტრესის პირობებში იწვევს ანტი-აპოპტოზური გენების ექსპრესიას [Hoon Ryu 2003].

სხვადასხვა ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია, რომ Sp1 ტრანსკრიფციის ფაქტორი გლუტამატის რეცეპტორის NR-1 სუბერთეულის ექსპრესიის ძირითად რეგულატორს წარმოადგენს. NMDA რეცეპტორის NR-1 სუბერთეულის ექსპრესია კორელირებს Sp1- დაკავშირებული ფაქტორების აქტივობასთან [Wolfman C. 2002]. ეს მონაცემები ადასტურებენ იმას, რომ Sp1 განაპირობებს kB-დაკავშირებული აქტივაციის გაზრდას ან შემცირებას და ჩართულია ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში არსებული NMDA რეცეპტორების აქტივობასთან უარყოფით უკუკავშირში.

### 3.3 NF-kB



NF-kB არის რედოქს-მგრძობიარე ტრანსკრიფციის ფაქტორი, რომელიც განაპირობებს როგორც პრო-, ისე ანტიაპოპტოზური გენების ექსპრესიას. NF-kB წარმოადგენს ცილების ჰომო- ან ჰეტეროდიმერს, და მიეკუთვნება NF-kB/Rel ოჯახს. მუდუმწოვართა უჯრედში იგი შეიცავს 5 სუბერთეულს: Rel A ანუ p65, Rel B, c-Rel, p50, p52. [Mark P. 2000].

NF-kB-ს არააქტიური ფორმა გვხვდება ციტოზოლში, როგორც 3-სუბერთეულის მქონე კომპლექსი p65 და p50 პროტოტიპული კომპონენტებით (ტრანსკრიფციის ფაქტორის დიმერი) და IκBα. სიგნალი, რომელიც ააქტივებს NF-kB, აინდუცირებს IκBα ფოსფორილებას, რომელიც თავის მხრივ იწვევს მის დისოციაციას p65 და p50. p65-p50 დიმერი შემდეგ გადაადგილდება ბირთვში და ურთიერთობს kB თანმიმდევრობასთან დნმ-ის შესაბამის ენჰანსერ რეგიონებში [Mark P. 2000].

NF-kB აქვს უნარი გაააქტივოს სუპეროქსიდდისმუტაზის (SOD) მაკოდირებელი გენი. ეს უკანასკნელი წარმოადგენს ანტიოქსიდანტურ ფერმენტს და იწვევს ოქსიდაციური სტრესის მოხსნას. NF-kB აქტივაციას იწვევს მრავალი ფაქტორი. მათ შორის: გლუტამატი, თავისუფალი რადიკალები, ინტერლეიკინ-1, კასპაზა-3 და სიმსივნის ნეკროზული ფაქტორი (TNF) [Kaltschmidt C. 1995]. ყველა მათგანი ჩართულია ცერებრალური იშემიის პათოგენეზში. საბოლოოდ ვითარდება აპოპტოზური დესტრუქცია. NMDA რეცეპტორების აგონისტების ტოქსიკური რაოდენობა იწვევს NF-kB-ს ბირთვში გადასვლას.

NF-kB რეგულირდება სპეციალური ცილოვანი ინჰიბიტორით IκBα და NF-kB აქტივაცია დამოკიდებულია მის დეგრადაციაზე, რომელიც ზემოთ ჩამოთვლილი ფაქტორების მიერ ხორციელდება.

NF-kB აქტივაციის შედეგია iNOS, p53 და ციკლინ D1-ის სინთეზი. NF-kB უკავშირდება iNOS-ის პრომოტორს [Yang J. 1997] და იწვევს iNOS მ-რნმ-ის სინთეზს გლიურ უჯრედში [Xie Q. W. 1994].

### **3.3.1 IκB**

თუ განვიხილავთ IκB ოჯახის წევრებს, სტრუქტურულად და ფუნქციონალურად ისინი შეიძლება დაიყოს ოთხ ჯგუფად:

- I. I $\kappa$ B- $\alpha$ ;
- II. I $\kappa$ B- $\beta$ ;
- III. I $\kappa$ B- $\gamma$ ;
- IV I $\kappa$ B- $\epsilon$ ; [Ghosh, S. 1990, Inoue. J. 1992,].

I $\kappa$ B $\alpha$  ყველაზე კარგადაა შესწავლილი, იგი ყველაზე გავრცელებულია I $\kappa$ B ოჯახის წევრებს შორის და მონაწილეობს NF- $\kappa$ B აქტივაციაში. I $\kappa$ B- $\alpha$  უკავშირდება Rel სპეციფიურ სუბერთეულს, კერძოდ Rel-A-ს.

I $\kappa$ B ხელს უშლის NF- $\kappa$ B-ს ბირთვში შესვლას, რადგანაც მასკირებას უკეთებს მის ტრანსლოკაციურ თანმიმდევრობას (NTS) [Hunter t. 1992]. როგორც უკვე ავლინებთ, სხვადასხვა ეგზოგენური სტიმულის საპასუხოდ I $\kappa$ B სუბერთეული ფოსფორილირდება, დისოცირდება და დეგრადირდება [Maginn E 2001]. ამის შემდეგ NF- $\kappa$ B-დიმერის ბირთვის ტრანსლოკაციური თანმიმდევრობა გამოჩნდება და NF- $\kappa$ B ტრანსლოცირდება ბირთვში [Hunter t. 1992], სადაც მას შეუძლია სხვადასხვა გენების ინდუცირება.

### **3.4 c-Jun**

c-Jun არის ტრანსკრიფციის ფაქტორი, რომელიც აქტივდება სხვადასხვა გარეგანი სტიმულებით, ისეთები როგორცაა ზრდის ფაქტორები, ციტოკინები, ნეიროტრანსმიტერები და სხვა [Melnikova I. 2001]. იგი წარმოადგენს ლეიციინის ელვიან ტრანსკრიფციის ფაქტორს და წარმოქმნის ჰეტეროდიმერებს ATF-2, c-Fos, JunD-თან, იწვევს პროაპოპტოზური გენების ექსპრესიას და განაპირობებს ნეიროდეგენერაციას.

c-Jun რეგულირდება MAPK-ის ოჯახის წევრებით, რომლებიც, როგორც უკვე აღინიშნა, ჩართულნი არიან აპოპტოზური სიგნალის ტრანსდუქციაში, ისევე როგორც უჯრედის ზრდასა და დიფერენციაციაში. ორი სხვადასხვა MAPK-კასკადი, რომელიც იკვეთება c-Jun და N-ტერმინალ კინაზებზე (JNK) და p38, უპირატესად აქტივდება ციტოტოქსიკური სტრესით, ულტრაიისფერი რადიაციით, გამა-დასხივებით, ოსმოსური შოკით და ექსტრაუჯრედული ციტოკინებით, აგრეთვე TNF (სიმსივნის ნეკროზული ფაქტორით) და ინტერლეიკინი-1 [Satoru Yamagishi 2003]. აპოპტოზის სიგნალ-რეგულირებადი კინაზა-1 (ASK-1) არის დიფერენციალურად ექსპრესირებული სერინ-ტრეონინ MAP კინაზა კინაზა კინაზა (MAPKKK), რომელიც ააქტივებს MKK4/7-

JNK და MKK3/MKK6-p38 სასიგნალო კასკადს. ASK-1 თამაშობს მთავარ როლს p-38 – c-Jun-გზის გააქტივებაში თავის ტვინის მარცვლოვანი ნეირონის კულტურაში LK ინდუცირებული აპოპტოზის დროს [Yamagishi S. 2003].

### **3.5 ATF-2**

ATF-2 ინდუცირდება და ფუნქციონირებს, როგორც უჯრედული პასუხი სტრესზე და ასტიმულირებს პროლიფერაციას მრავალ ქსოვილში. თუმცა ნერვულ სისტემაში ATF-2 ექსპრესირდება მხოლოდ დაზიანებულ ნეირონებში. იგი ლეიცილის ელვიანი ტრანსკრიფციის ფაქტორია, რომელიც წარმოქმნის ჰეტეროდიმერებს c-Jun, c-Fos, JunD-თან, იწვევს პროაპოპტოზური გენების ექსპრესიას და განაპირობებს ნეიროდეგენერაციას. ზეექსპრესირებული ATF-2 აინჰიბირებს მიტოგენაქტივირებად კინაზის კინაზის კინაზა1 (MEKKK1), JNK-ინდუცირებულ აპოპტოზს და აინდუცირებს ნეირიტის ელონგაციას Akt-ს აქტივაციით P12 უჯრედებსა და განგლიონურ ნეირონებში [Nakagomi S. 2003].

დამტკიცებულია, რომ ATF-2 და c-Jun-ის კომბინაცია აინდუცირებს ანტიაპოპტოზურ ფაქტორს Hsp27--ს, რომელიც უშუალოდ თუ არაპირდაპირ ააქტივებს Akt-ს, აინჰიბირებს აპოპტოზს და განაპირობებს ნერვის ელონგაციას. სხვადასხვა მონაცემებით ნაჩვენებია, რომ ATF-2 და c-Jun - ინდუცირებული Hsp27-ის არის საპასუხო რეაქცია ნეირონებს გადარჩენისათვის, რომლებიც იმყოფებიან სტრესის ქვეშ, ისეთი როგორცაა ნერვის დაზიანება.

### **3.6 CREB**

CREB წარმოადგენს ტრანსკრიფციულ ფაქტორს, რომელიც აქტივირდება უჯრედშიდა Ca-ის დონის ცვლილების საპასუხოდ. CREB ჩართულია მრავალ ბიოლოგიურ პროცესში და შეიძლება გააქტივირებულ იქნას სხვადასხვა უჯრედგარე სიგნალებით. თავის ტვინში იგი ჩართულია სინაპსურ პლასტიკურობაში და ნეირონების პრევენციის პროცესებში. CREB-ის გააქტივება ხდება ფოსფორილირებით

133 სერინის ნაშთზე RSK2-კინაზას საშუალებით, რომელიც თავის მხრივ აქტივდება მემბრანულ რეცეპტორთან შეუღლებული სასიგნალო კასკადით, რომელშიც შედის ადენილატციკლაზა, Ras-MAPK , PKC (პროტეინკინაზა C) და CaMKII გზები. გააქტიურებული CREB -ის იდენტიფიკაცია შესაძლებელია ფიზიოლოგიურად აქტიურ თავის ტვინში ისეთი განსხვავებული ქცევითი აქტების დროს, როგორებიცაა კოკაინის მიღება, შიშის შეგრძნება და სივრცითი მეხსიერება და ა.შ. [Maginn E.2001].

### 3.7 JunD

JunD ტრანსკრიფციის ფაქტორი მიეკუთვნება Jun ოჯახს, რომელშიც აგრეთვე შედის c-Jun და JunB ფაქტორები. JunD წარმოადგენს ლეიციინის ელვიან ტრანსკრიფციის ფაქტორს და შედის AP-1 ჰეტეროდიმერულ კომპლექსში, სადაც ურთიერთქმედებს Jun, Fos და ATF ოჯახის ცილებთან [Leppa 2001]. JunD-ს აქტივობა აუცილებელი და მნიშვნელოვანია პოსტნატალური განვითარების პროცესებში. როგორც ნაჩვენებია, JunD-ს გააქტივება ხორციელდება JNK-ით ფოსფორილირების საშუალებით, მაგრამ გააქტიურების ზუსტი მექანიზმი აღწერილი არ არის.

აღმოჩენილია, რომ JunD-ს გააქტივება თრგუნავს უჯრედების პროლიფერაციას და შესაბამისად ხელს უშლის ტრანსფორმაციას, რაც Ras-ის ეფექტის საწინააღმდეგოა. JunD-ს ანტიკანცეროგენული მოქმედება აიხსნება იმით, რომ JunD უშუალოდ უკავშირდება *MEN1* სიმსივნის სუპრესორული გენის ცილოვან პროდუქტს – მენინს.

### 3.8 c-Fos

არსებობს ტრანსკრიფციის ფაქტორების Fos-ოჯახის სხვადასხვა იზოფორმა: c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2 [Casalino 2003]. c-Fos წარმოადგენს ლეიციინის ელვიან ტრანსკრიფციის ფაქტორს და გააქტივებისას წარმოქმნის დიმერებს ATF-2, c-Jun, JunD ტრანსკრიფციის ფაქტორებთან. c-Fos-ს აქტივაცია რეგულირდება MAP-პროტეინკინაზების ფოსფორილებით. რეგულაცია აგრეთვე ხორციელდება RhoA-დამოკიდებული გზითაც, მაგრამ ეს მექანიზმი ჯერ-ჯერობით არ არის ცნობილი [Bo Cen 2003]. c-Fos-ის

ტრანსკრიფციული აქტივობა კონტროლირდება ზრდის ფაქტორების სიგნალით. ეს კონტროლი ხორციელდება c-Fos-ის დიმერიზაციით, რის შედეგადაც წარმოიქმნება აქტიური ტრანსკრიფციის ფაქტორი [Todd A 2003].

c-Fos ჩართულია სხვადასხვა ტიპის უჯრედების უჯრედულ პროლიფერაციაში. მნიშვნელოვანი ინფორმაცია c-Fos-ის როლის შესახებ მიღებულია ნოკაუტირებულ თაგვებში, სადაც მალიგნირებელი პროგრესიის მქონე ცხოველურ მოდელებში ჩატარებული ცდებში ნაჩვენებია იყო, რომ c-fos გენის პროდუქტი აქტიუტრად მონაწილეობს v-H-ras ონკოგენის ექსპრესიის რეგულაციაში [Ikeda K. 2003]. აგრეთვე დადგენილია, რომ აპოპტოზის წინ აღინიშნება c-Fos-ს ექსპრესიის მაღალი დონე [Ikeda K. 2003].

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს იმ შესაძლო უჯრედშიდა მექანიზმების შესწავლა, რომლებიც ახორციელებენ Ras პროტონკოცილის დადმავალი ეფექტორებისადმი სპეციფიკურობის რეგულაციას და განსაზღვრავენ მის ფიზიოლოგიურ პასუხს ტრანსკრიფციულ დონეზე.

## თავი II. კვლევის მასალა და მეთოდები.

### 2.1 კვლევის რეაქტივები

სამუშაოში გამოყენებული იყო შემდეგი რეაქტივები: PMSF (ფენილ მეთილ სულფონილ ფლუორიდი), ტრიფსინი, ტრისი (Tris), ნატრიუმის დოდეცილსულფატი (SDS), გუანიდინტრიფოსფატი (GTP), გლიცინი, პარაფორმალდეჰიდი (PFA), CHAPS, HEPES, ხარის შრატის ალბუმინი (BSA), ჩანასახოვანი ხარის შრატი (FBS), DMEM (დულბეკოს მოდიფიცირებული იგლის არე), MTT, ფოლინი, ვერცხლის ნიტრატი (AgNO<sub>3</sub>), L-NAME (L-ნიტრო-არგინინ-მეთილ-ესთერი), მანუმინი A, ფარნეზილტრანსფერაზა (FT-ase), ფარნეზილპიროფოსფატი, დიეთილენტრიამინ პენტამმარმჟავა (DTPA) ფირმა „Sigma“-ს (აშშ); ნატრიუმის დეოქსიქოლატი, დითიოტრიტოლი, ფირმა „Serva“-ს (გერმანია); Tween 40, ედტა, ეგტა, DEAE-Servacell გელი, Sephadex G75 გელი ფირმა „Reanal“-ის (უნგრეთი); 2-მერკაპტოეთანოლი,

ცისტეინი, აზოტის ნიტრიტი ფირმა „*Fluka*“-ს (შვეიცარია); აპროტინინი (Trasylol) ფირმა „*Bayer*“-ის (გერმანია); ლეუპეპტინი (Gordox) უნგრეთის წარმოების; პირველადი ანტისხეულები – p-ERK (sc-7383), p-Akt (sc-16646), p-JNK (sc-6254), H-Ras (sc-35), K-Ras (sc-30) და მეორადი ანისხეულები anti-mouse (sc-2005), anti-rabbit (sc-2004), anti-rat (sc-2006) ფირმა „*Santa Cruz Biotechnology*“-ს (აშშ), BD Mercury TM TransFactor Kit კომპანიასაგან „*BD Biosciences Clontech*“ (აშშ), ცილების ECL სადეტექციო ხსნარი 1 და 2, ნიტროცელულოზის მემბრანა ფირმა „*Amersham*“-ის (ინგლისი) ფირმა „*Hybond*“-ის (ინგლისი). პოლიეთილენიმინით (PEI) დაფარული ფირფიტები ფირმა „*Macherey-Magel*“-ის (გერმანია), CNBr- აქტივირებული Sepharose 4B, Mono Q (HR5/5) ფირმა „*Pharmacia*“-ს (შვედეთი), [<sup>14</sup>C]-GTP, PPO, POPOP ფირმა „*Koch-Light Labor*“-ის (გერმანია).

რუსული წარმოების ყველა რეაქტივი (გლიცეროლი, ნატრიუმის კარბონატი და ჰიდროკარბონატი, ნატრიუმის ერთ და ორფუძიანი ფოსფატები, კალიუმის ქლორიდი, კალიუმის ორფუძიანი ფოსფატი, ნატრიუმის ქლორიდი, მაგნიუმის ქლორიდი, სპილენძის სულფატი, ტარტრატი, მარილმჟავა და ცხენის შრავი, ტოლუოლი) იყო ქიმიურად სუფთა ან განსაკუთრებით სუფთა კვალიფიკაციის.

ხსნარებს ვამზადებდით დეიონიზირებულ წყალზე, რომელსაც ვატარებდით „*Milli-Q Water System*“-ის (Millipore, საფრანგეთი) აპარატზე.

## 2.2. კვლევის მეთოდები

**2.2.1. ციტოპლაზმური Ras ცილის ქრომატოგრაფიული გასუფთავება ხარის თავის ტვინის ქერქიდან.** ქრომატოგრაფიული გასუფთავების პროცესში გამოყენებული იყო შვიდი სახის ბუფერი: ბუფერი A – 25mM TrisHCl pH 7.5, რომელიც შეიცავდა 1mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM მაგნიუმის ქლორიდი, 0.5 mM PMSF, 5 ერთეული/მლ აპროტინინი და 5 მგ/მლ ლეუპეპტინი. ბუფერი B – 20 mM TrisHCl pH 7.5, რომელიც შეიცავდა 1mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 5 ერთეული/მლ აპროტინინი და 5 მგ/მლ ლეუპეპტინი. ბუფერი C – 20mM TrisHCl pH 7.5, რომელიც შეიცავდა 1mM DTT, 1 mM EDTA, 5 mM მაგნიუმის ქლორიდი, 10 mM კალიუმის დიჰიდროფოსფატი, 5 ერთეული/მლ

აპროტინინი და 5 მგ/მლ ლეუპეპტინი. ბუფერი D – 0.1M ნატრიუმის დიჰიდროფოსფატი pH 7.4. ბუფერი E – 0.1M გლიცინიHCl pH 2.8. ბუფერი F – 1M ნატრიუმის დიჰიდროფოსფატი pH 8.0. ბუფერი G – 20mM კალიუმის დიჰიდროფოსფატი pH 7.4, რომელიც შეიცავდა 1mM DTT, 1 mM EDTA.

გასუფთავების ყოველი ეტაპი მიმდინარეობდა 0-4°C ტემპერატურაზე. ხარის ტვინის ქერქის ქსოვილი ჰომოგენიზირებული იყო იმავე მოცულობის ბუფერ A-ში. ციტოზოლური ფრაქციები მიღებული იყო სამი დაცენტრიფუგირების შედეგად, შესაბამისად 2000 გ, 10000გ, 100000გ-ზე. საბოლოო სუპერნატანტი დატანილი იყო DEAE-Servacell გელზე, რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ B-თი და რომლის ელუციაც ხდებოდა NaCl საფეხურებრივი გრადიენტით ბუფერ B-ში. თანმიმდევრულად 100mM, 200mM, 300mM და 2M NaCl. მიღებულ ფრაქციებში განისაზღვრა GTP-აზური აქტივობა.

შემდგომი გასუფთავების დროს გამოყენებული იყო 300mM NaCl-ზე მიგებული ფრაქცია. ბუფერ C-ს წინააღმდეგ ჩატარებული დიალიზის შემდეგ ცილოვანი ფრაქცია დატანილი იყო Sephadex G-75 სვეტზე (4,5×60სმ). ჩამოხსნა ხდებოდა ბუფერ C-თი 30ml/h სიჩქარეზე. ყოველი ფრაქცია წარმოდგენილი იყო 5ml მოცულობით, რომელშიც ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა. Sephadex G-75 სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ მეორე პიკში ჩამოსული ფრაქციები დავიტანეთ Ras ანტისხეულებიან Sepharose სვეტზე.

ანტისხეულ-დაკავშირებული Sepharose სვეტის დამზადება ხდებოდა შემდეგნაირად: CNBr-Sepharose ჩავალბეთ 1mM HCL-ში 30 წუთის განმავლობაში, გავფილტრეთ და გავრეცხეთ 0.1M NaHCO<sub>3</sub> ბუფერში pH 8.3., რომელიც შეიცავდა 0.5M NaCl. დავამატეთ 500μl ანტი-Ras ანტისხეული 10 მლ ფისზე (10მგ/1მლ) და ვაინკუბირებდით 2 საათის განმავლობაში მუდმივი მორევით, შემდეგ ვრეცხავდით იგივე ბუფერით 10-ჯერ უფრო დიდი მოცულობით. გარეცხილი ფისი რესუსპენდირდებოდა 20 მლ 0.5M ამინოეთანოლში pH8.2., ინკუბირდებოდა 16 საათის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე ნელი მორევით. შემდეგ სტადიაზე ფისი ირეცხებოდა დისტილატით, ორ-ორჯერ 40 მლ 0.1M NaHCO<sub>3</sub> ბუფერით pH 8.3., რომელიც შეიცავდა 0.5M NaCl და 40 მლ 0.1M ძმარმჟავას ბუფერით pH4.0, რომელიც

შეიცავდა 0.5M NaCl., და საბოლოოდ ისევ pH8.3-იანი ბუფერით. მიღებული ფისით იტენებოდა ქრომატოგრაფიული სვეტი (1×7სმ), რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ D-თი. ჩამოხსნა ხდებოდა ბუფერ E-თი 15 მლ/სთ სიჩქარით.

pH-ის განეიტრალება მიღწეული იყო შეგროვებული ფრაქციების სინჯარებში ბუფერი F-ის დამატებით (ოცჯერ კონცენტრირებული). ანტისხეულ-Sepharose სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ პიკში ჩამოსული ფრაქციები დიალიზდებოდა მთელი ღამის განმავლობაში და შემდეგ ეტაპზე დატანილ იქნა Mono Q-ს HR5/5 სვეტზე, რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ G-თი. ჩამოხსნა ხდებოდა 40 მლ NaCl-ის კონცენტრაციული გრადიენტით 50 მლ/სთ სიჩქარეზე (0-დან 0,3 M). მიღებული ფრაქციები წარმოდგენილი იყო 1 მლ მოცულობის ოდენობით, რომელშიც განსაზღვრული იყო GTP-აზური აქტივობა. მესამე, მთავარ პიკში ჩამოსული აქტიური ფრაქციების ლიოფილიზაცია და შესწავლა მოვახდინეთ.

### 2.2.2. მემბრანასთან დაკავშირებული Ras ცილის გასუფთავება ხარის თავის ტვინის ქერქიდან.

ხარის ტავის ტვინის ქერქი ჰომოგენიზირებული იყო ბუფერ A-ში 1:1-თან მოცულობით და შემდეგ დაცენტრიფუგირეთ ორჯერ 2000g და 1000g-ზე, რის შედეგადაც მივიღეთ სინაპსური მემბრანები. მეორე ნალექი შევავროვეთ და მოვახდინეთ მემბრანების სოლუბილიზაცია 4,5%-იანი ნატრიუმის დიოქსიქოლატის ხსნარით, ბუფერ B-ში და ვაინკუბირეთ 1სთ-ის განმავლობაში. მემბრანული ცილოვანი ფრაქციები მივიღეთ 10000 g-ზე 1სთ-ის განმავლობაში დაცენტრიფუგირების შედეგად.

მიღებული სუპერნატანტი დავიტანეთ Sephadex G-75-ზე, რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ C-თი, იგი შეიცავდა 0,5% ნატრიუმის დიოქსიქოლატს. სვეტიდან ელუცია მოვახდინეთ ბუფერ C-თი 30 მლ/სთ სიჩქარით. შეგროვებული იყო 5-5 მლ მოცულობის ფრაქციები და გავზომეთ GGTP-აზური აქტივობა.

Sephadex G-75 ქრომატოგრაფიული სვეტიდან მეორე პიკის დროს ჩამოსული ფრაქციები შევაერთეთ და დავიტანეთ ანტი-Ras-ანტისხეული-Sepharose სვეტზე (1×7სმ), რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ D-თი. ელუცია მიმდინარეობდა ბუფერ E-თი 15მლ/სთ სიჩქარეზე. ყოველი ეტაპის შემდეგ ვახდენდით Western blotting-



ს და GTP-აზური აქტივობის განსაზღვრას. ჩამოსულ ფრაქციებში pH-ის გასანეიტრალეზად თავდაპირველად დამატებული იყო ბუფერი F (ოცჯერ ნაკლები მოცულობით). მიღებული ფრაქციების დიალიზი ხდებოდა წყლის წინააღმდეგ, მთელი დამის განმავლობაში.

ეს სინჯები შემდგომში დავიტანეთ Mono Q HR5/5 სვეტზე (10სმ სიგრძის), გაწონასწორებული იყო ბუფერ G-თი, რომელიც შეიცავდა 0,68% CHAPS. ელუცია ხდებოდა 40 მლ NaCl-ის ხაზობრივი გრადიენტით (0-დან 0,3M) 50მლ/სთ სიჩქარეზე. შევავროვეთ 1-1მლ მოცულობის ფრაქციები და გავზომეთ GTP-აზური აქტივობა. მესამე, მთავარი პიკის დროს ჩამოსული აქტიური ფრაქციები შევავროვეთ, გავუკეთეთ ლიოფილიზაცია და შევისწავლეთ.

### 2.2.3. ელექტროფორეზული ანალიზი პოლიაკრილამიდის გელზე.

მიღებული ცილების ფრაქციების ანალიზი ხდებოდა ბრტყელი გელის „Phast System Separation and Control Unit” (*Pharmacia*, შვეცია) აპარატზე. სინჯებს ვუმატებდით იმავე მოცულობის ელექტროფორეზის ბუფერს (20% გლიცეროლი, 10% 2-მერკაპტოეთანოლი, 6% ნატრიუმის დოდეცილსულფატი, 0.02-0.04% ბრომფენილ ლურჯი 250mM Tris-HCl pH6.7) და ვადულებდით 3 წუთის განმავლობაში. ელექტროფორეზს ვატარებდით 10-15% პოლიაკრილამიდის Phast-SDS გელზე ცილების სრულ დაყოფამდე. ცილების შეღებვა ხდებოდა 0.25% ვერცხლის ნიტრატით, გამჟღავნების რეაგენტი – 0.015% პარაფორმალდეჰიდი, 25% ნატრიუმის კარბონატი. შეღებვა ხდებოდა Phast System Development Unit –ში (*Pharmacia*, შვედეთი), Phast System Development File-ის რეკომენდაციით.

### 2.2.4. GTP-აზური აქტივობის განსაზღვრა.

10 $\mu$ ლ ცილის ხსნარი (70 $\mu$ გ) პრეინკუბირებული იყო [ $^{14}$ C]-GTP (660000cpm-3nM) 30 წთ-ის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე 40მკლ საერთო მოცულობის 50mM HEPES ბუფერში (pH-7,6), რომელიც შეიცავდა 0,2 მგ/მლ BSA და 1mM EDTA. GTP-აზური რეაქციების ინიციაცია ხდებოდა MgCl<sub>2</sub>-ის დამატებით (5mM). სინჯარიდან ვიღებდით 10მკლ და [ $^{14}$ C]-GDP პროდუქციას ვზომავდით თხელშრიანი ქრომატოგრაფიით PEI-

ფირფიტაზე (პოლიეთილენიმინი). ნუკლეოტიდების დაყოფა ხდებოდა ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 0,75M კალიუმის დიჰიდროფოსფატს (pH3,5). GDP-ის რაოდენობა ისაზღვრებოდა სცინტილაციურ ხსნარში (4 გრ PPO და 0.05 გრ POPOP 1ლიტრ ტოლუოლში) სცინტილაციური მთვლელის მეშვეობით და GTP-აზური გაზომვის ექსპერიმენტული ცდომილება იყო 10-დან 20%-მდე.

### 2.2.5. გასუფთავებული Ras ცილის ფარნეზილირება.

*in vitro* გასუფთავებული Ras ცილის ფარნეზილირებას ვახდენდით [Berezovski et al, 2002] მიხედვით. სარეაქციო არე შეიცავდა Ras ცილის ხსნარს (30მგ/მლ-ზე) ფარნეზილტრანსფერაზას (საბოლოო კონცენტრაციით 100 nM) (FT-ase), ფარნეზილპიროფოსფატს (საბოლოო კონცენტრაციით 50 nM), 10 mM მაგნიუმის ქლორიდი, 5 mM DTT, 50 mM HEPES pH 7.5.

რეაქციის დაწყება ხდებოდა Ras ცილის დამატებით. შესადარებლად ვაწარმოებდით საკონტროლო ექსპერიმენტს, სადაც Ras ცილის მაგივრად დამატებული იყო ფერმენტული ბუფერი. GTP-აზური აქტივობის გასაზომად 0, 20, 40 და 60 წუთის ინტერვალით სარეაქციო არედან ვიღებდით 10-10  $\mu$ l, რომელსაც ვაწვეთებდით PEI ფირფიტაზე.

### 2.2.6. გასუფთავებული Ras ცილის ნიტროზილირება.

*in vitro* გასუფთავებული Ras ცილის ნიტროზილირებას ვახდენდით [Williams et al, 2003]-ის მიხედვით. სარეაქციო არე შეიცავდა Ras ცილის ხსნარს (30მგ/მლ), S-ნიტროზოცისტეინს (0,6mM), 10mM მაგნიუმის ქლორიდს, 5mM DTT, 50mM HEPES, pH-7,5. S-ნიტროსოცისტეინის მზადდებოდა უშუალოდ ცდის წინ 100mM L-ცისტეინის (გახსნილი 0.25M მარილმჟავაში) და 100mM ნატრიუმის ნიტრიტის თანაბარი მოცულობით შერევის შედეგად. S-ნიტროზოცისტეინის მისაღებად ინკუბაცია გრძელდებოდა 10 წუთი სრულ სიბნელეში. შემდეგ მიღებულს ხსნარს ვუმატებდით 4:1 თანაფარდობით 20mM TrisHCl ბუფერს, რომელიც შეიცავდა 1mM დიეთილენტრიამინ პენტამარმჟავას (DTPA). განზავების შემდეგ pH მიგვყავდა 7.4-მდე.

პარალელურ ექსპერიმენტებში დამატებული იყო FTase (100nM) და ფარნეზილპიროფოსფატი (10 $\mu$ M). რეაქციის ინიცირება ხდებოდა Ras ცილის

დამატებით. საკონტროლო ექსპერიმენტები ტარდებოდა Ras ცილის ნაცვლად ფერმენტული ბუფერის დამატებით. GTP-აზური აქტივობის გასაზომად 0, 20, 40, 60 წთ-ის ინტერვალებით ვიღებდით 10-10  $\mu$ l ხსნარს და ვაწვეთებდით PEI ფირფიტაზე.

**2.2.7. პირველადი შერეული კულტურის მიღება [Miyamoto 1989].** პირველადი გლია-ნეირონული კულტურა მიღებული იყო ახალშობილი ვირთაგვების თავის ტვინიდან. უჯრედების დისოციაცია ხდებოდა DMEM-ში, რომელიც შეიცავდა 10% ჩანასახოვანი ხარის შრატს (FBS) და 2mM L-გლუტამინს, 30 წუთიანი მონელების შემდეგ 0.027% ტრიფსინის ხსნარში.

**2.2.8. უჯრედული კულტურების გაზრდა.** მიღებული პირველადი შერეული გლია/ნეირონული კულტურის გაზრდა ხდებოდა ინკუბატორში 37°C ტემპერატურაზე 5% CO<sub>2</sub>-ის პირობებში DMEM საკვები არის გამოყენებით. ინკუბაცია აქტიურ ნაერთებთან (L-NAME საბოლოო კონცენტრაციით 1mM, მანუმიცინი საბოლოო კონცენტრაციით 10  $\mu$ M) ხდებოდა 24 საათის განმავლობაში, რის შემდეგაც ამ უჯრედული სუსპენზიისაგან მიიღებოდა ციტოპლაზმური და ბირთვული ექსტრაქტები.

**2.2.9. ციტოპლაზმური და ბირთვული ექსტრაქტების მიღება [BD Mercury Protocol].** შესაბამის ნაერთებთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ არსებულ უჯრედულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი 450g-ზე. სუპერნატანტს ვღვრიდით. ნალექს ვუმატებდით ორჯერ მეტი მოცულობით ლიზისის ბუფერს (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1mM DTT, ლეუპეპტინი, აპროტინინი, 10mM HEPES, pH7,9). უჯრედების გახეთქვას ვაწარმოებდით არის №27 ნემსით ათჯერ გატარებით. მიღებულ ჰომოგენატს ვაცენტრიფუგირებდით 20 წუთი 10000g-ზე. მიღებულ სუპერნატანტს ვინახავდით ცალკე სინჯარებში 4°C-ზე, როგორც ციტოზოლურ ფრაქციას. დარჩენილ ნალექს ვუმატებდით იგივე მოცულობის ბირთვული ექსტრაქციის ბუფერს (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42M NaCl, 0.2mM EDTA, 25%(მოცულობით) გლიცეროლი, 1mM DTT, ლეუპეპტინი, აპროტინინი, 20mM HEPES pH7.9). ბირთვების გახეთქვას ვაწარმოებდით

ზემოთაღწერილი მეთოდით ახალი ნემსის გამოყენებით. მიღებულ ჰომოგენატს ვაყოვნებდით 30 წუთი 4°C-ზე მუდმივი შენჯღრევით. დაყოვნების შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 30 წუთი 20000g-ზე. მიღებულ სუპერნატანტი გადაგვქონდა სუფთა სინჯარებში და ვინახავდით -70°C-ზე, როგორც ბირთვულ ექსტრაქტს.

**2.2.10. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა.** ცილის კონცენტრაციის დადგენა ორივე ტიპის მიღებულ ექსტრაქტში ხდებოდა ლოურის მეთოდის მიხედვით [Lowry 1951]. ამისათვის მზადდებოდა ორი ხსნარი: A – 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.4% NaOH, 1% SDS, 0.16% ტარტრატი; B- 4% CuSO<sub>4</sub>. უშუალოდ განსაზღვრის წინ მზადდებოდა ხსნარი C – A და B ხსნარების ურთიერთშერევით შეფარდებით 100:1. 250µლ სინჯს ვუმატებდით 750µლ ხსნარ B-ს და ვაინკუბირებდით 50 წუთი 25°C-ზე. შემდეგ ვუმატებდით 75µლ ფოლინს და ვაინკუბირებდით კიდევ 30 წუთი. ოპტიკურ შთანთქმას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრზე 660nm-ის სიგრძის ტალღაზე. კონცენტრაციას ვადგენდით ალბუმინის მაგალითზე აგებულ სტანდარტების მრუდთან შედარებით.

**2.2.11. ცილების იმუნობლოტინგი.** სხვადასხვა ცილოვანი პროდუქტების (ჩვენ შემთხვევაში p-ERK, p-Akt, p-JNK და Ras) დონის განსაზღვრას ციტოზოლურ ექსტრაქტებში ჩვენ ვახდენდით Western blotting-ის მეთოდით Hybond ECL ნიტროცელულოზის მემბრანაზე [Samdani 1997].

ამისათვის ვაკეთებდით სინჯების დენატურაციას ელექტროფორეზის ბუფერთან (20% გლიცეროლი, 10% 2-მერკაპტო-ეთანოლი, 6% ნატრიუმის დოდეცილსულფატი, 0.02-0.04% ბრომფენილ ლურჯი 250mM Tris-HCl pH6.7) 3-წუთიანი დუღილით და ვუშვებდით ელექტროფორეზზე ბრტყელი გელის „Phast System Separation and Control Unit” აპარატზე. ელექტროფორეზს ვატარებდით 10-15% პოლიაკრილ-ამიდის Phast-SDS გელზე სრულ დაყოფამდე.

ტრანსფერი გელიდან ნიტროცელულოზის მემბრანაზე ხდებოდა 70°C-ზე 90 წუთის განმავლობაში მცირე წნეხის ქვეშ. ტრანსფერის ეფექტურობის დასადგენად მემბრანა შემდგომ იღებებოდა Ponceau S საღებავით გადასული ცილების რაოდენობის

სანახავად. საღებავის ამორეცხვა ხდებოდა PBS ბუფერით (pH 7.6). მემბრანის თავისუფალი ზედაპირის ბლოკირებისათვის ხდებოდა მემბრანის 60-წუთიანი ინკუბაცია მახლოკირებელ ხსნარში – 5% blocking reagent TBS-Tween ბუფერში (TBS ბუფერი: 20mM Tris, 137mM NaCl, 3.8mM HCl, pH7.6, TBS-Tween ბუფერი: 0.05% Tween-40 TBS ბუფერში)

ბლოკირების შემდეგ მემბრანას 3-ჯერ ვრეცხავდით TBS-Tween-ით და ვაინკუბირებდით 60 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე პირველად ანტისხეულთან ერთად (ანტისხეულის განზავება 1:1000). ინკუბაციის შემდეგ მემბრანას 3-ჯერ ვრეცხავდით TBS-Tween-ით. შემდეგ ვაინკუბირებდით 45 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე, შესაბამის მეორად ანტისხეულთან (HRP-კონიუგირებული. განზავება 1:1000). მემბრანას ვრეცხავდით 3-ჯერ ვრეცხავდით TBS-Tween-ით 4-4 წუთი და ერთხელ მარტო TBS ბუფერით (Tween-ის გარეშე).

მემბრანის დეტექცია ხდებოდა ქემილუმინესცენციის გზით, რისთვისაც გამოიყენებოდა ECL-ის detection solution1 და detection solution2 ნარევი, პროპორციით 1:1. მიღებულ ხსნარს ვასხამდით მემბრანაზე და ვტოვებდით 1 წუთი, რის შემდეგაც ვაცილებდით ზედმეტ სითხეს და ვათავსებდით SaranWrap-ცელოფანში, ვაცილებდით ჰაერის ბუშტებს, ვდებდით რენტგენის კასეტაში და ვადებდით Hybond-ის ფირს 1 საათით, ფირს ვამჟღავნებდით Kodak-ის developer-ში და fixer-ში.

**2.2.12. ტრანსკრიფციის ფაქტორების დონის განსაზღვრა:** ბირთვულ ექსტრაქტში ხდება BD Mercury TM TransFactor Kit-ის გამოყენებით, როგორც აღწერილია ფირმა-მწარმოებლის აღწერაში [BD Mercury Protocol].

კიტის შემადგენლობაში შედის ფოსოები, რომელთა ზედაპირზე დაკავშირებულია სხვადასხვა ტრანსკრიფციული ფაქტორების შესატყვისი პრომოტორული დნმ-ის თანმიმდევრობები. თავდაპირველად ხდებოდა ფოსოების თავისუფალი ზედაპირის ბლოკირება 150µl სპეციალური TransFactor/Blocking ბუფერით 15 წუთის განმავლობაში. შემდეგ ხდებოდა ფოსოს ამოშრობა და 15 µl სინჯის დამატება (სინჯი - 6 µl ბირთვული ექსტრაქტი ცილის კონცენტრაციით 6 µg/µl + 44 µl TransFactor/blocking ბუფერი). ინკუბაცია სინჯთან გრძელდებოდა 60 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე.

ინკუბაციის შემდეგ ფოსოს 3-ჯერ ვრეცხავდით 150-150  $\mu$ l TransFactor/Blocking ბუფერით 4-4 წუთი. რეცხვის შემდეგ თითო ფოსოში ვუმატდით 100-100  $\mu$ l პირველად ანტისხეულს (განზავება მითითებულია კიტის ინსტრუქციაში და სხვადასხვა განსხვავებული ტრანსკრიფციის ფაქტორებისათვის) ინკუბაცია 60 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე, რის შემდეგაც ფოსოებს ვრეცხავდით 150-150  $\mu$ l ზემოთ აღნიშნული ბუფერით 3-ჯერ 4-4 წუთის განმავლობაში. რეცხვის შემდეგ ხდებოდა ინკუბაცია 100  $\mu$ l მეორად ანტისხეულთან (განზავება მითითებულია ინსტრუქციაში) და ინკუბაცია 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ რეცხვა 4-ჯერ 250-250  $\mu$ l TransFactor ბუფერით 4-4 წუთი.

გარეცხილ ფოსოებს ვუმატებდით 100-100  $\mu$ l TBM სუბსტრატს, ინკუბაცია ოთახის ტემპერატურაზე დაახლოებით 10-20 წუთი, სანამ ფოსო არ შეიფერება ცისფრად. რეაქციის შეჩერება ხდებოდა 100  $\mu$ l 1M  $H_2SO_4$ -ით და შთანთქმა იზომებოდა სპექტროფოტომეტრით 450ნმ სიგრძის ტალღაზე.

**2.2.13. მიღებული შედეგების სტატისტიკური დამუშავება** ხდებოდა one-way ANOVA ანალიზით. ყოველი ექსპერიმენტიდან მიღებული მონაცემების ანალიზი ხდებოდა ცალ-ცალკე. როდესაც ANOVA ანალიზით მიიღებოდა სარწმუნო მაჩვენებელი შედეგების შედარება ხდებოდა t-ტესტით.

### თავი III. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

#### 3. Ras-ცილის მოდიფიკაციების (ფარნეზილირების და ნიტროზილირების) გავლენა მის GTP-აზურ აქტივობაზე.

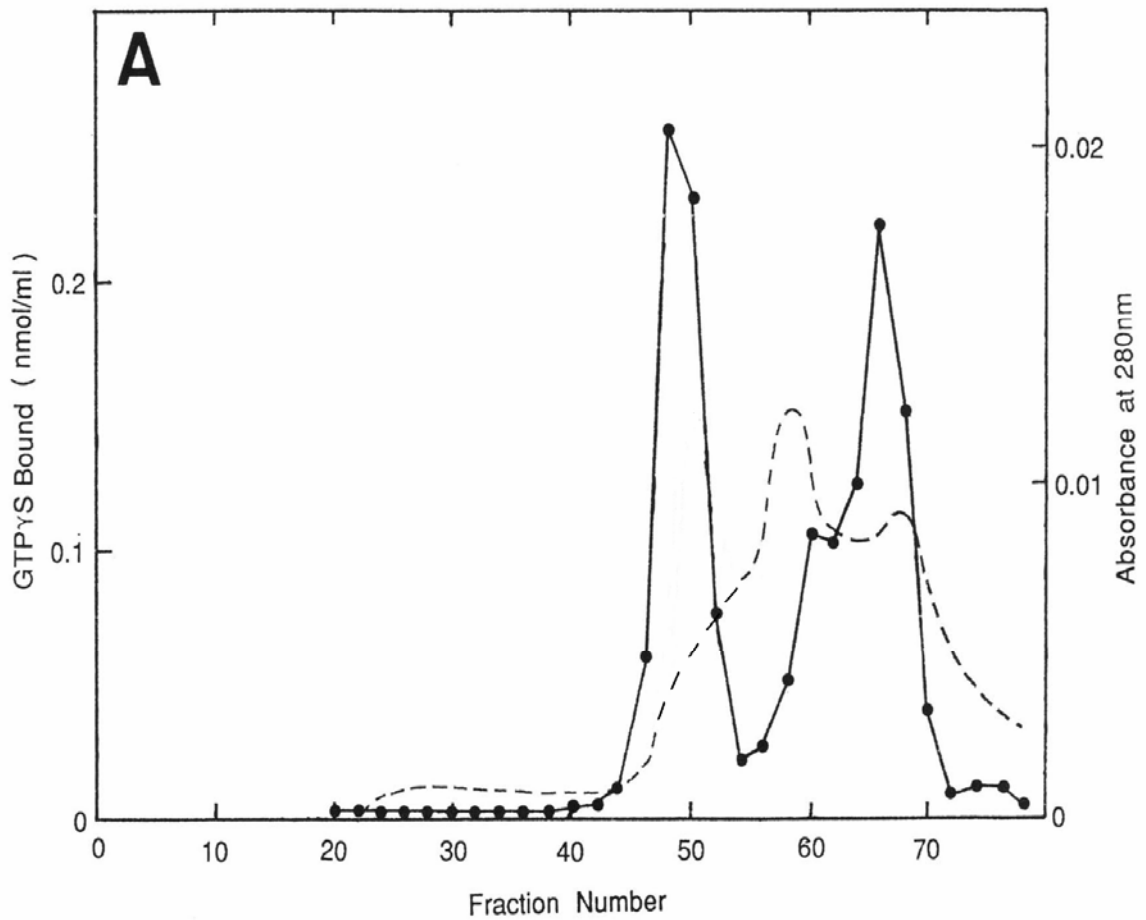
Ras-ოჯახის ცილები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ორგანიზმში მიმდინარე მრავალ ბიოლოგიურ პროცესში, რომლებიც იწვევენ უჯრედის მორფოლოგიის, გენების ექსპრესიის ცვლილებებს, მონაწილეობენ უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის ზრდაში და აპოპტოზში [Olson and Marias 2000]. Ras ცილის ბიოლოგიური აქტივობა ნაწილობრივ რეგულირდება პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციებით, რომელთა შორის აღსანიშნავია ფარნეზილირება (იზოპრენის ჯგუფის ჩართვა და შემდგომ ცილის

მემბრანაში ჩაშენება) და ნიტროზილირება (ცისტეინის ნაშთებზე ნიტროზილის ჯგუფის დაკავშირება), დღეს-დღეისობით ზემოთაღნიშნული მოდიფიკაციების გავლენა Ras-ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე და ბიოლოგიურ ფუნქციობაზე შესწავლილი არ არის. Ras-ცილის ფარნეზილირება აუცილებელია ცილის მემბრანაში გადასვლისათვის და ამ პროცესში, როგორც უკვე ზემოთ იყო აღნიშნული, მონაწილეობს ფერმენტი ფარნეზილტარნსფერაზა, რომელიც აკატალიზებს თიოეთერული ბმით დაკავშირებული ფარნეზილის ჯგუფის გადატანას ფარნეზილპროფოსფატიდან ცილის C-ტერმინალურ ცისტეინის ნაშთზე. C-ტერმინალურ სხვა მოდიფიკაციებთან ერთად იზოპრენული დამატება განსაზღვრავს ცილის შიდაუჯრედულ ლოკალიზაციას და ასოციაციას სპეციფიკურ მემბრანულ ცილებთან [Pennisi et al.1997, Barbakadze et al.2005].

Ras-პროტეინოცილის მოლეკულა შეიცავს ცისტეინის ნაშთებს, რომლებიც შესაბამის პირობებში შესაძლებელია ნიტროზილირდეს აზოტის ოქსიდით [Lader 1996]. ცისტეინის ნაშთებს შორის წამყვან როლს 118-ე ცისტეინის ნაშთი თამაშობს, რომელიც ლოკალიზებულია NKXD გუანინ-ნუკლეოტიდ დამაკავშირებელ თანმიმდევრობასთან, და Cys-181, Cys-184 და Cys-186, რომლებიც ცილის C-ტერმინალურ რეგიონში მდებარეობენ. Cys-181, Cys-184 და Cys-186 ჩვეულებრივ მოდიფიკაციების სამიზნეს და ნიტროზილირებისათვის პოტენციურ მარეგულირებელ საიტებს წარმოადგენენ [Williams et al., 2003]. ამგვარად, Ras-ის მოლეკულის 186-ე ცისტეინის მოდიფიკაციის ტიპმა (იქნება ეს ფარნეზილირება თუ ნიტროზილირება) შესაძლოა წამყვანი როლი ითამაშოს ამ ცილის ბიოლოგიური აქტივობის რეგულაციაში. ზემოთთქმულიდან გამომდინარე მნიშვნელოვანი ხდება ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების Ras-ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე გავლენის შესწავლა.

Ras-ცილის ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების მის GTP-აზურ აქტივობაზე გავლენის გამოსაკვლევად, მოვახდინეთ Ras-ცილის გასუფთავება და მისი სუფთა პრეპარატის სახით მიღება. რამოდენიმე ქრომატოგრაფიული საფეხურის გამოყენებით გავასუფთავებულ იქნა ციტოპლაზმური და მემბრანასთან დაკავშირებული Ras-ცილები ხარის თავის ტვინიდან. ხარის ტვინის ქერქის ქსოვილი ჰომოგენიზირებული იყო, საფეხურებრივი დაცენტრიფუგირებების შედეგად მიღებული ციტოზოლური და

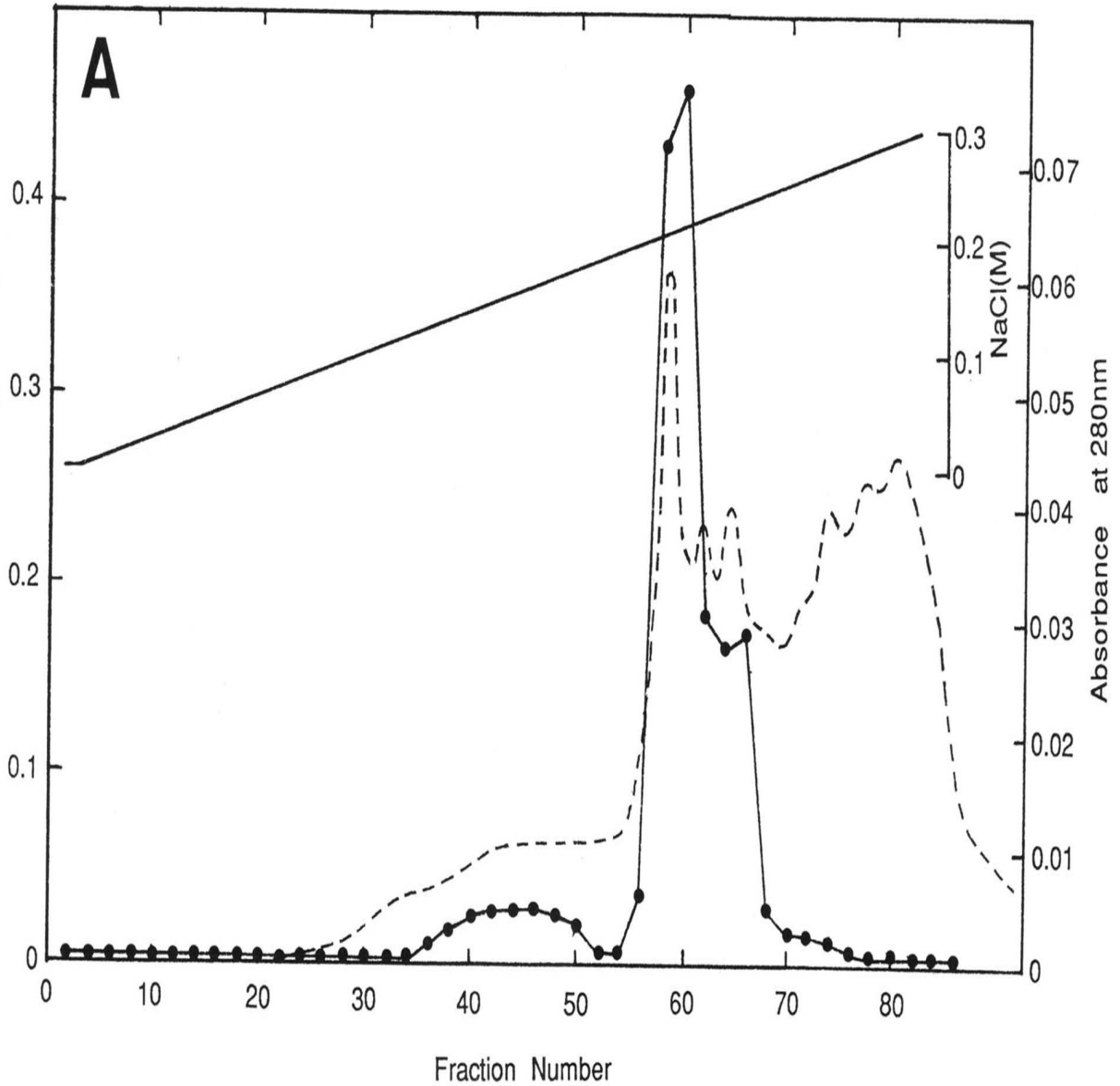
მემბრანული ფრაქციები სუპერნატანტი დატანილი იყო DEAE-Servacell გელზე, ელუცია ხდებოდა ნატრიუმის ქლორიდის საფეხურებრივი გრადიენტით თანმიმდევრულად 100mM, 200mM, 300mM და 2M NaCl კონცენტრაციით. ელუციის შედეგად მიღებულ ფრაქციებში ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა, და შემდგომი გასუფთავებისათვის გამოყენებული იყო 300mM NaCl-კონცენტრაციაზე მიღებულ ფრაქცია. ეს ფრაქცია დატანილი იყო Sephadex G-75 სვეტზე. Sephadex G-75 სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ მეორე პიკზე ჩამოსული აქტიური ფრაქციები (სურათი 5) დატანილი იყო Ras-ანტისხეული-დაკავშირებული Sepharose-ის სვეტზე.



სურათი 5. Sephadex G-75 გელ-ფილტრაციის სვეტიდან ჩამოსული ელუატების ქრომატოგრამა. ცილის კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა გამდინარე სპექტოფოტომეტრით 254ნმ სიგრძის ტალღაზე. ყოველი ფრაქცია წარმოდგენილი იყო 5ml მოცულობით, რომელშიც ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა



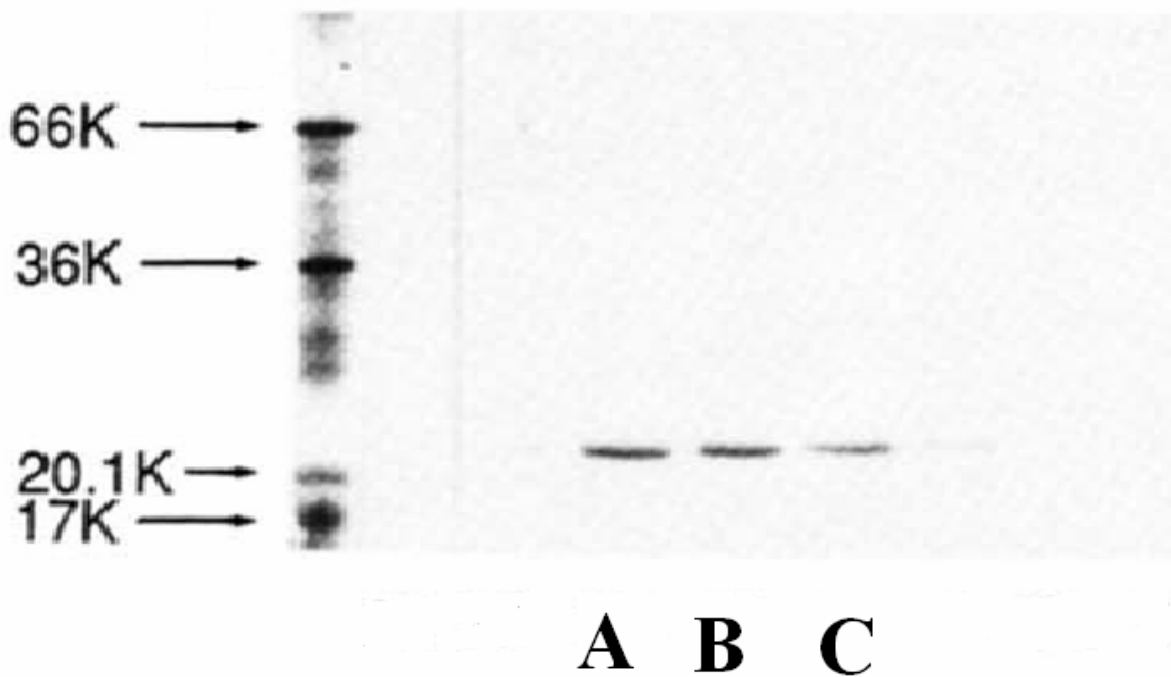
Ras-ანტისხეულ-დაკავშირებულ Sepharose-ის სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ პიკზე ჩამოსული ფრაქციები შემდეგ ეტაპზე დატანილ იქნა Mono Q-ს HR5/5 სვეტზე, მოვახდინეთ პირველ, მთავარ პიკზე ჩამოსული აქტიური ფრაქციების ლიოფილიზაცია და ელექტროფორეზული შესწავლა (სურათი 6).



სურათი 6. MonoQ (HR5/5) იონ-ცვლადი სვეტიდან ჩამოსული ელუატების ქრომატოგრამა. ცილის კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა გამდინარე სპექტოფოტომეტრით

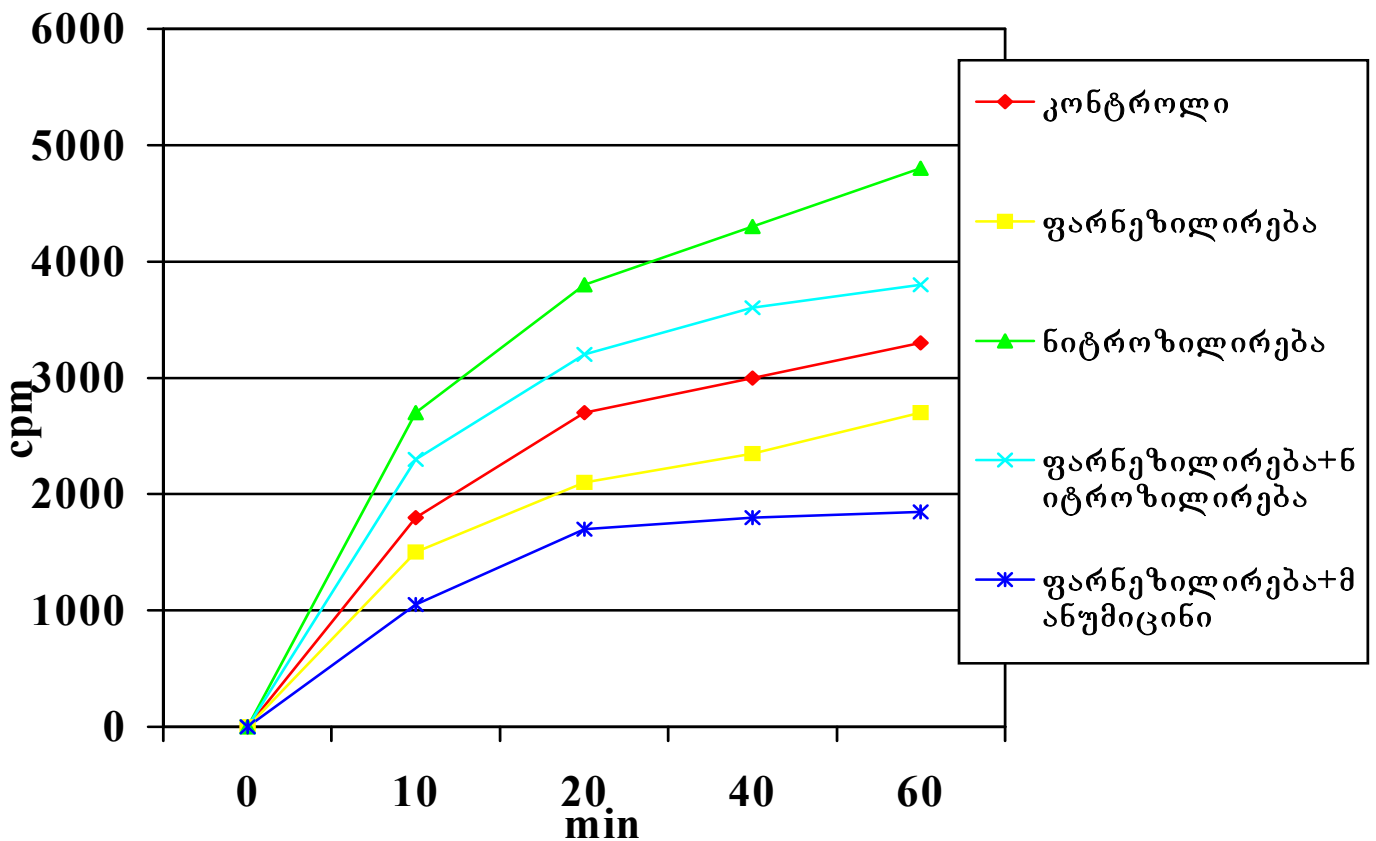
2546მ სიგრძის ტალღაზე. ყოველი ფრაქცია წარმოდგენილი იყო 1ml მოცულობით, რომელშიც ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა

საბოლოოდ მიღებული, გასუფთავებული პრეპარატების (ციტოპლაზმური და მემბრანული) სისუფთავის დასადგენად ვატარებდით SDS-ელექტროფორეზულ ანალიზს პოლიაკრილამიდის გელზე, შედეგა ხდებოდა ვერცხლის ნიტრატით (სურათი 7) ცილების GTP-აზური აქტივობა ისაზღვრებოდა დროზე დამოკიდებულ დინამიკაში და იზომებოდა ინკუბაციის ერთ საათიანი პერიოდის განმავლობაში. ციტოპლაზმური Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა უდრიდა დაახლოებით  $6,5 \pm 0,4$  pmole  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ , როდესაც მემბრანასთან დაკავშირებული Ras-ცილის აქტივობა ტოლი იყო  $18,7 \pm 0,9$  pmole  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  ჩვენი ექსპერიმენტების პირობებში.



სურათი 7. Mono Q (HR5/5) სვეტიდან ჩამოსული ელუატის ელექტროფორეზული ანალიზი SDS-პოლიაკრილამიდის გელზე. მარკერებად გამოყენებული იყო ტრიპსინინჰიბიტორი (20.1კდა), A - ციტოზოლური პრეპარატი, B- მემბრანული პრეპარატი, C - სტანდარტული ცილა (Sigma, USA). დატანილი ცილის რაოდენობა შეადგენდა 5მგ.

გასუფთავებულ Ras-ცილაზე ფარნეზილირებისა და ნიტროზილირების ეფექტების შესასწავლად, გასუფთავებული პრეპარატები ინკუბირებული იყო ნიტროზილირებისათვის S-ნიტროზოცისტეინთან, ხოლო ფარნეზილირებისათვის – ფარნეზილტრანსფერაზასა და ფარნეზილდიფოსფატთან. დადგინდა, რომ S-ნიტროზოცისტეინის არსებობის პირობებში ციტოპლაზმური Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა შესამჩნევად გაზრდილი იყო, როდესაც Ras-ცილის ფარნეზილირება იწვევდა GTP-აზური აქტივობის მნიშვნელოვან ინჰიბირებას (სურ 8).



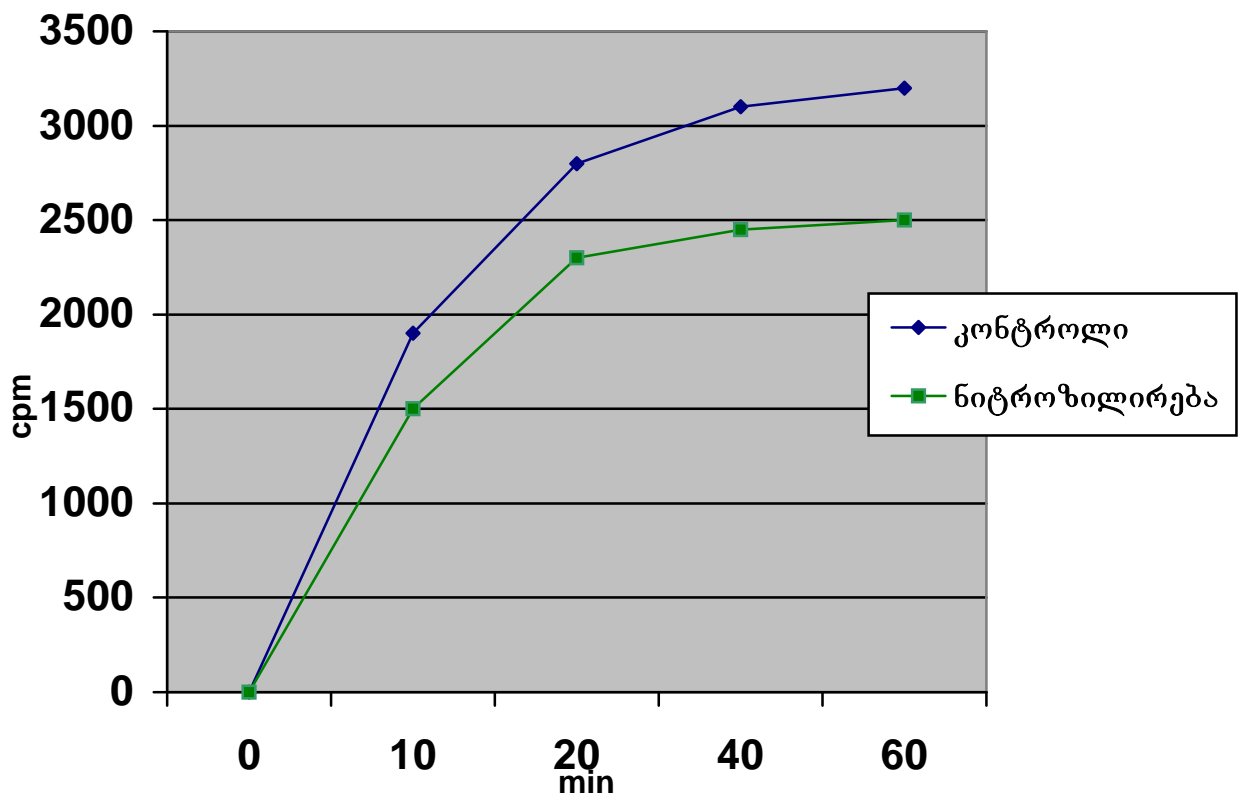
სურათი 8. ფარნეზილირებისა და ნიტროზილირების გავლენა ციტოზოლური Ras ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე

ფარნეზილტრანსფერაზასა და ფარნეზილდიფოსფატის დამატება საინკუბაციო არეში, ამცირებდა ციტოპლაზმური Ras-ცილის GTP-აზურ აქტივობას საკონტროლო

ექსპერიმენტთან შედარებით 83%-მდე. იგივე პირობებში ფარნეზილირებული Ras-GTP-აზური აქტივობა ტოლი იყო  $5,4 \pm 0,4 \text{ pmole. mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , როდესაც ნიტროზილირებული Ras-GTP-აზური აქტივობა საკონტროლო პრეპარატებთან შედარებით საკმაოდ გაზრდილი იყო და  $9,8 \pm 0,6 \text{ pmole. mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  უდრიდა. ამგვარად, ნიტროზილირება და ფარნეზილირება ციტოზოლური ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე და შესაბამისად მის ბიოლოგიურ ფუნქციობაზე ურთიერთსაწინააღმდეგო ეფექტს ახდენენ.

რაც შეეხება მემბრანასთან დაკავშირებულ (შესაბამისად უკვე ფარნეზილირებულ) Ras ცილას, მისი GTP-აზური აქტივობა შესწავლილი იყო S-ნიტროზოციტეინთან ინკუბირების შემდეგ (სურ. 9). ნიტროზილირებული მემბრანასთან დაკავშირებული Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა შემცირდა საკონტროლო ექსპერიმენტთან შედარებით 73%-მდე და ტოლი იყო  $13,6 \pm 0,6 \text{ pmole. mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , რომელიც განსაზღვრული იყო საექსპერიმენტო განსაზღვრულ პირობებში. ეს შედეგები ადასტურებენ წარმოდგენას, რომ ცისტეინის სხვადასხვა ნაშთები ციტოპლაზმურ და მემბრანასთან დაკავშირებულ Ras-ცილებში განიცდიან ნიტროზილირებას და ეს მრავალმხრივი მოდიფიკაციები შესაძლოა არეგულირებენ GTP-აზურ აქტივობას.

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ციტოპლაზმური (დეფარნეზილირებული) Ras-ცილის ნიტროზილირება იწვევს GTP-აზური აქტივობის მნიშვნელოვან სტიმულაციას. შესაბამისად ექსპერიმენტებში დადგინდა, რომ Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა ინჰიბირდებოდა ფარნეზილირებით, და აქტივობის დონე ნაწილობრივ აღდგებოდა NO-ს დონორის არსებობის პირობებში (Cys-NO).



სურათი: 9. ნიტროზილირების გავლენა მემბრანასთან დაკავშირებულ Ras ცილაზე.

ეს მონაცემები ადასტურებენ იმას, რომ C-ტერმინალური ცისტეინის ნაშთის, კონკრეტულად Cys-186-ის ნიტროზილირება NO-ს დონორის რეაგენტით, ცვლის ცილის იზოპრენილირებას. თუ მხედველობაში მივიღებთ იმას, რომ Ras-ცილა მუდმივად განიცდის გააქტივირებას GTP-ის დაკავშირებით და ინაქტივირებას GDP-ის დაკავშირებით, ე.ი Ras-ცილის გააქტივებაში მალიმიტირებელ საფეხურს წარმოადგენს GDP-ის ჩანაცვლება GTP-ით. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემების თანახმად, Ras-ცილის GTP-აზურმა აქტივობის მატებამ ნიტროზილირების გავლენის პირობებში შესაძლოა გაახანგრძლივოს ცილის არააქტიური მდგომარეობა. უფრო მეტიც, აღსანიშნავია, რომ გასუფთავებული Ras-მოლეკულიდან AAX-თანმიმდევრობის პროტეოლიზური მოცილება და მიღებული კარბოქსიბოლოს კარბოქსიმეთილირება ამ შემთხვევაში (ნიტროზილირების არსებობის პირობებში) შეუძლებელი ხდება. ამგვარად, შეიძლება დავასკვნათ, რომ მხოლოდ ფარნეზილირება არის საკმარისი Ras-GTP-აზური

აქტივობის ინჰიბირებისთვის და შესაბამისად Ras-ის აქტიურ GTP დაკავშირებულ მდგომარეობაში შენარჩუნებისათვის. ამით შეიძლება აიხსნას ის ფაქტი, რომ ფარნეზილტრანსფერაზული რეაქციის ზოგიერთი ინჰიბიტორი იწვევს Ras-დამოკიდებულ ავთვისებიანი სიმსივნის რეგრესიას და ხელს უწყობს მკურნალობას სხვადასხვა ჰემატოლოგიურ ავთვისებიან სიმსივნეებში [Mazieres, 2004]. NO-დონორის უნარი პირდაპირ და ეფექტურად შეამციროს Ras-ცილის ფარნეზილირების პროცესი, შესაძლოა გამოყენებული იყოს მრავალი მძიმე დაავადების თერაპიაში, რაც შემდგომში განაპირობებს აზოტის ოქსიდის დონორების სხვადასხვა სახის სიმსივნის მკურნალობაში გამოყენების სტრატეგიას.

პროტეოლიზური რეაქციის შედეგად მემბრანასთან დაკავშირებულ Ras-ცილა კარგავს CAAX-თანმიმდევრობას და შესაბამისად C-ტერმინალური Cys-186 და H-Ras, N-Ras და K-Ras4A შემთხვევაში ერთი (N-Ras) ან ორი (H-Ras და K-Ras4A) Cys-ის ნაშთი განიცდის პალმიტირებას. ამრიგად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ NO-ს არსებობის პირობებში მხოლოდ Cys-118 მოდიფიცირდება. ზოგმა კვლევებმა აჩვენა, რომ NO-ს შეუძლია Ras-ის მოდიფიცირება Cys-118-ში, რაც აძლიერებს გუანონუკლეოტიდურ ცვლას და მონაწილეობს სასიგნალო გადაცემის დადებითი რეგულაციაში [Mott 1997. Williams 2003].

მიღებული შედეგები დაემთხვა მოცემულ შედეგებს, რადგან აღმოჩნდა, რომ NO-დონორი იწვევს GTP-აზური აქტივობის ინჰიბირებას და აძლიერებს Ras-თან GTP-ის დაკავშირების ხანგრძლივობას. ras გენის წერტილოვანი მუტაციები ყველაზე ხშირად დომინანტ ონკოგენის მუტაციის სახით ნაპოვნია ადამიანის სიმსივნეში. ყველაზე აქტიური მუტაციები აზიანებენ GTP-აზურ აქტივობას და ამით აჩერებენ Ras GTP-დაკავშირებულ მდგომარეობაში, რის შედეგადაც ხდება ზრდის სტიმულაციის გახანგრძლივება. სიმსივნეებში Ras-ის მუტაციების განსაზღვრა შესაძლებლობას მოგვცემს გავერკვეთ კიბოს ბიოლოგიასა და პათოგენეზში, რასაც შესაძლოა კლინიკური მნიშვნელობა ჰქონდეს ადრეულ დიაგნოსტიკასა და პროგნოზში და აგრეთვე თერაპიული საშუალებების შემუშავებაში [Herrera, 2002].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, შეიძლება დავასკვნათ, რომ ციტოპლაზმური Ras, ისევე როგორც მემბრანასთან დაკავშირებული Ras შეიძლება მოდიფიცირდეს

ნიტროზილირებით. ციტოპლაზმური ცილები შეიძლება ნიტროზილირდეს C-ტერმინალურ Cys-186 ნაშთზე, რაც განაპირობებს შემდგომი ფარნეზილირების, AAX-თანმიმდევრობის პროტეოლიზური მოცილების და დარჩენილი კარბოქსიბოლოს კარბოქსიმეთილირების და მემბრანაში გადასვლის პრევენციას. აგრეთვე ციტოპლაზმური Ras-ის აქტიური GTP-თან დაკავშირების პერიოდის შემცირებისკენ. საპირისპირო შეიძლება ითქვას მემბრანა დაკავშირებულ Ras-ზე, რომელიც ნიტროზილირდება Cys-118-ზე და მიღებული მოდიფიკაცია ამცირებს GTP-აზურ აქტივობას ანუ Ras-ის აქტიურ GTP-თან დაკავშირების ხანგრძლივობა გაზრდილია.

## **2. აზოტის ოქსიდის სინთაზისა და ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბირება ცვლის ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობას**

Ras და მისი კასკადი ერთ-ერთ მთავარ რეგულაციურ სისტემას წარმოადგენს, რადგანაც მისი აქტივაცია უჯრედის ფუნდამენტურ ცვლილებებთან არის დაკავშირებული. Ras-ცილა, რომლის გენის მუტაციაც ონკოგენურ ტრანსფორმაციას განაპირობებს, იწვევს ერთის მხრივ უჯრედების აპოპტოზს, ხოლო მეორე მხრივ სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას. Ras-ცილის ასეთი ორმაგი მოქმედება განისაზღვრება დადმავალ რეგულაციურ სისტემებზე მისი ზემოქმედების მიმართულებით [Crespo et al. 2000]. Raf/MEK/ERK გზის გააქტივებით Ras ცილა იწვევს აპოფტოზს, ხოლო PI3/Akt გზით კი იგი უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ზრდის. Ras-ის ეფექტი ტრანსკრიფციული ფაქტორების შერჩევით აქტივაციაში აისახება, რომლებიც პრო- ან ანტი-აპოფტოზური გენების ექსპრესიას იწვევენ.

საინტერესოა, რომ მექანიზმი, რომლითაც ხორციელდება Ras-ის დადმავალი სპეციფიკის რეგულაცია, დღემდე ცნობილი არ არის. აქედან გამომდინარე ჩვენ მიერ შესწავლილი იყო Ras დადმავალი ეფექტორების აქტივობები. Ras დამოკიდებული დადმავალი გზის დასახასიათებლად და მასზე მისი ზოგიერთი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის გავლენის დასადგენად გამოყენებული იყო ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორი – მანუმიცინი და NO-სინთაზას ინჰიბიტორი – L-NAME. როგორც

ცნობილია, მანუმიცინის მაინჰიბირებელი ეფექტი ფარნეზილტრანსფერაზაზე ხორციელდება მისი სუბსტრატთან ფარნეზილპროფოსფატის კონკურენციის გზით და ფართოდ გამოიყენება Ras-სასიგნალო გზის დასახსიათებლად.

თავდაპირველად შესწავლილი იყო აღნიშნული მოდიფიკაციების ინჰიბიტორების გავლენა უჯრედების სიციცხლისუნარიანობასა და სამი ცენტრალური პროტეინკინაზური კასკადის (Akt, ERK და JNK) აქტივაციის ხარისხზე.

ჩატარებული ექსპერიმენტებით დადგინდა, რომ არც მანუმიცინს და არც L-NAME-ს გამოყენებულ კონცენტრაციებში არ აქვს მნიშვნელოვანი აპოპტოზური ეფექტი გლიანეირონულ უჯრედებზე. რაც შეეხება პროტეინკინაზურ აქტივობას, აღმოჩნდა, რომ მანუმიცინსა და L-NAME-ს თანადროული ან ცალკეული ზემოქმედების შედეგად მცირდება Akt-ს ფოსფორილების ხარისხი, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ შიდაუჯრედული NO-ს კონსტიტუციური დონე და ფარნეზილტრანსფერაზას ფიზიოლოგიური აქტივობა აუცილებელია PI3-კინაზა/Akt-გზის ჩართვისთვის (სურ. 10).



სურათი 10. Akt-ს ფოსფორილების დონის ცლილება მანუმიცინთან (10  $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად (Western Blotting ანალიზი) სურათი წარმოდგენილია სამი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი ცდის მონაცემებით

უფრო მეტიც, გაირკვა, რომ მანუმიცინი L-NAME-ს მსგავსად ზრდის ERK-ს ფოსფორილების ხარისხს. როგორც ჩანს, ეს არის მეტაბოლიზმის დარღვევის შედეგი,



რომელსაც ადგილი აქვს NO-ს კონსტიტუციური დონის ან მუდმივი ფარნეზილირების ცვლილების დროს და იგი, შესაძლებელია ატარებდეს კომპენსაციურ ხასიათს. მანუმიცინისა და L-NAME-ს თანადროული არსებობისას ERK-ს ფოსფორილირების ხარისხი აღდგება ნორმალურ დონემდე, ანუ საკონტრო სინჯებში არსებულ დონემდე (სურათი 11). ეს მონაცემები მიუთითებენ იმაზე, რომ ფარნეზილირების ინჰიბირება და NO-ს კონცენტრაციის შემცირება ერთდროულად არ ცვლის ERK-ს ფოსფორილირების ხარისხს.

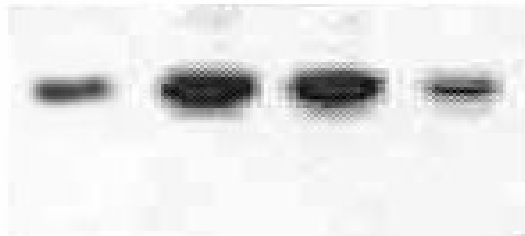


<b>Manumicin</b>	-	+	-	+
<b>L-NAME</b>	-	-	+	+

**სურათი 11. ERK-ას ფოსფორილების დონის ცვლილება მანუმიცინთან (10 $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად (Western Blotting ანალიზი).** სურათი წარმოდგენილია სამი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი ცდის მონაცემებით

შემდგომ ექსპერიმენტებში გაირკვა, რომ მანუმიცინი არ ცვლის კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი სასიგნალო პროტეინკინაზის – JNK ფოსფორილირების ხარისხს, მაგრამ ამ პროტეინკინაზის ფოსფორილირებული ფორმების რაოდენობა იზრდება L-NAME-ს თანაობისას. ეს ფაქტი შეიძლება აიხსნას იმით, რომ NO-ს კონსტიტუციური დონე JNK-ს სუპრესიას განაპირობებს (სურათი 12), ხოლო მისი გააქტივება კომპენსაციურ ხასიათს ატარებს და JNK-ს გააქტივებისთვის Ras-ის არც ფარნეზილირება და არც ნიტროზილირება არ არის აუცილებელი. ამ მონაცემების საფუძველზე შესაძლებელია

დავასკვნათ, რომ სარეგულაციო გზების გარკვეულ დონეებზე ნიტროზილირება კვეთს ფარნეზილირებას, რის შედეგადაც იცვლება შუამავალი პროტეინკინაზების აქტივობა. ამ კვეთის წერტილს ჩვენ შემთხვევაში Ras პროტონკოცილ წარმოადგენს.



**p - ERK**

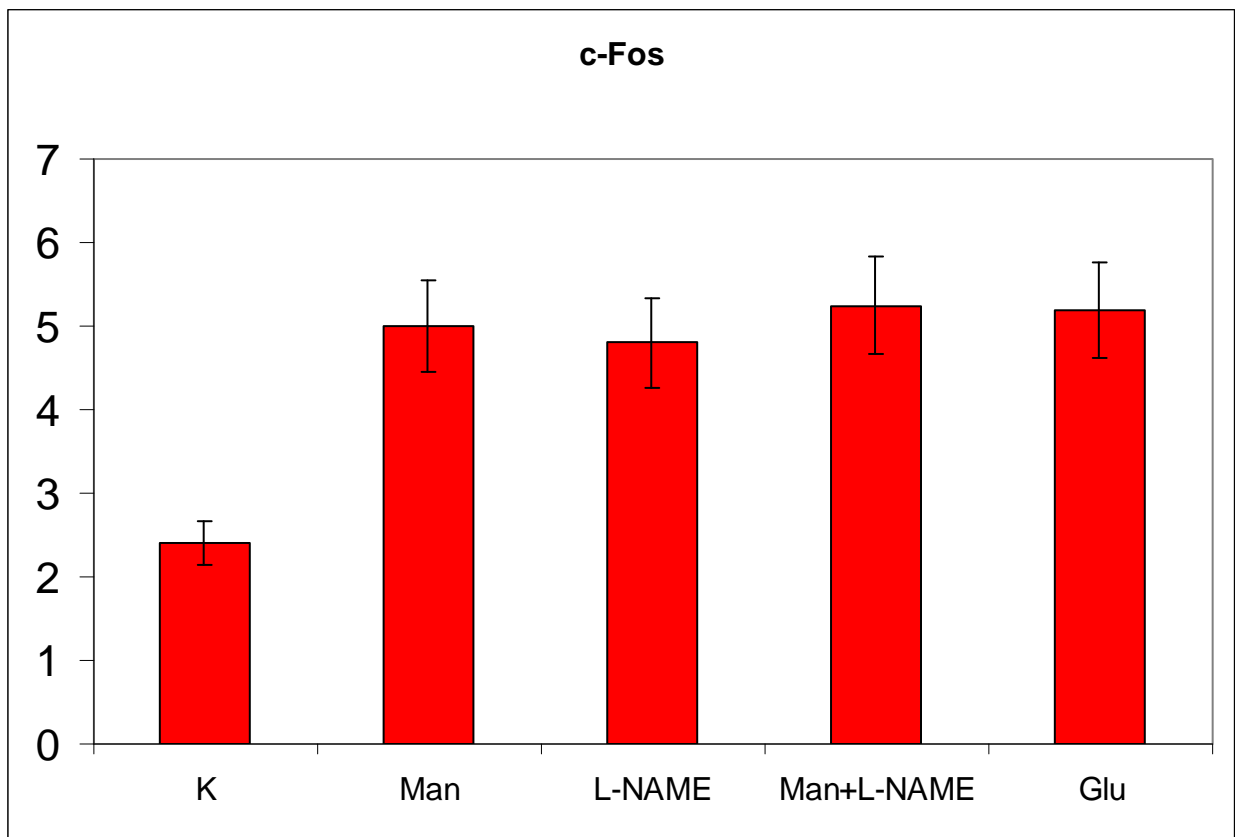
<b>Manumicin</b>	-	+	-	+
<b>L-NAME</b>	-	-	+	+

სურათი 12. JNK-ის ფოსფორილების დონის ცლილება მანიმიცინთან (10 $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად (Western Blotting ანალიზი) სურათი წარმოდგენილია სამი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი ცდის მონაცემებით

ცნობილია, რომ Raf/MERK/ERK და PI3-კინაზა/Akt სასიგნალო გზები ზემოქმედებენ ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობაზე, მათ შორის c-Fos, c-Jun, NF- $\kappa$ B, STAT, ATF-2, CREB და Sp1 [Garrington, 1999] და ამგვრად ახდენენ თავის ეფექტს გენთა ექსპრესიაზე.

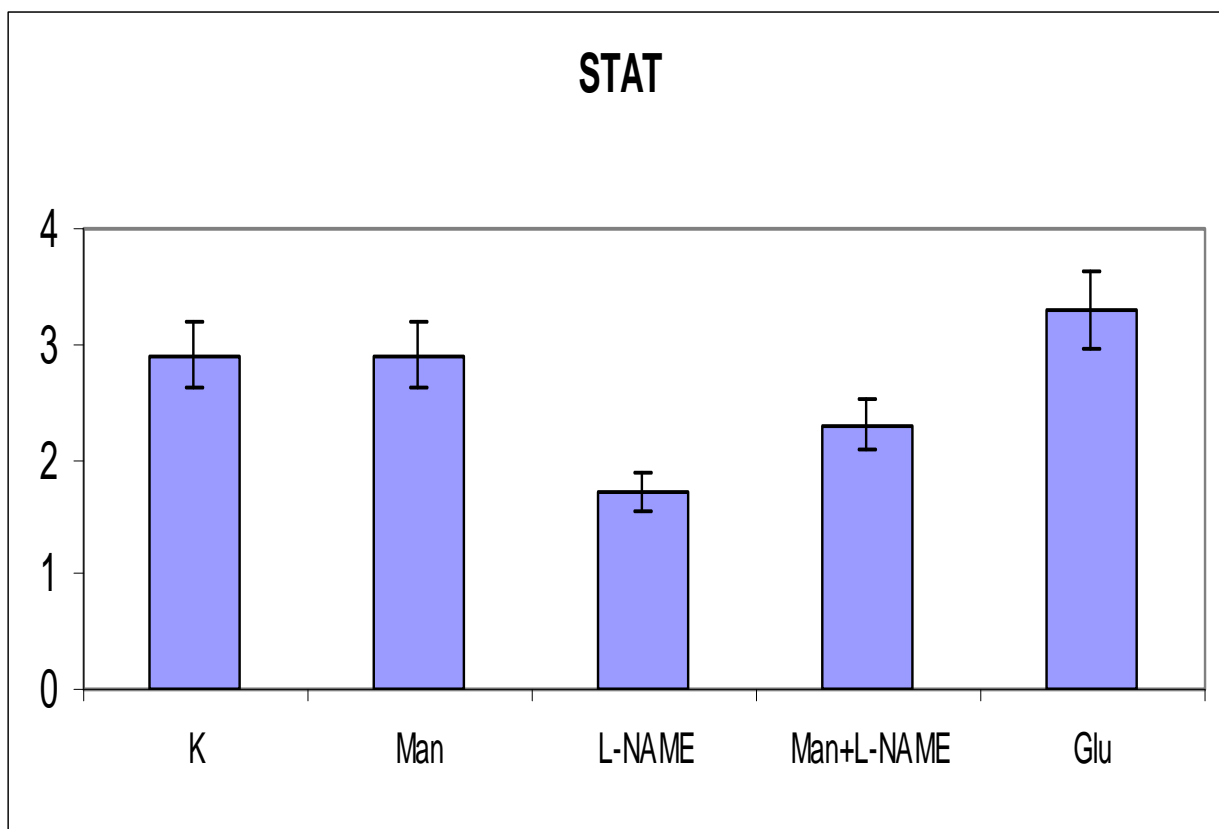
ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტების შემდგომ სერიებში განსაზღვრული იყო მოცემული ტრანსკრიფციული ფაქტორების დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა L-NAME-სა და მანუმიცინის თანაობისას. დადგინდა, რომ მანუმიცინისა და L-NAME-ს ცალკეული და თანადროული ზემოქმედებისას c-Fos-ის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა იზრდება (სურათი 13). მიღებული შედეგი მიუთითებს იმაზე, რომ ფარნეზილირებული და ნიტროზილირებული Ras-ი ამცირებს c-Fos-ის აქტივობას.

სურათი 13. c-Fos-ის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10  $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები



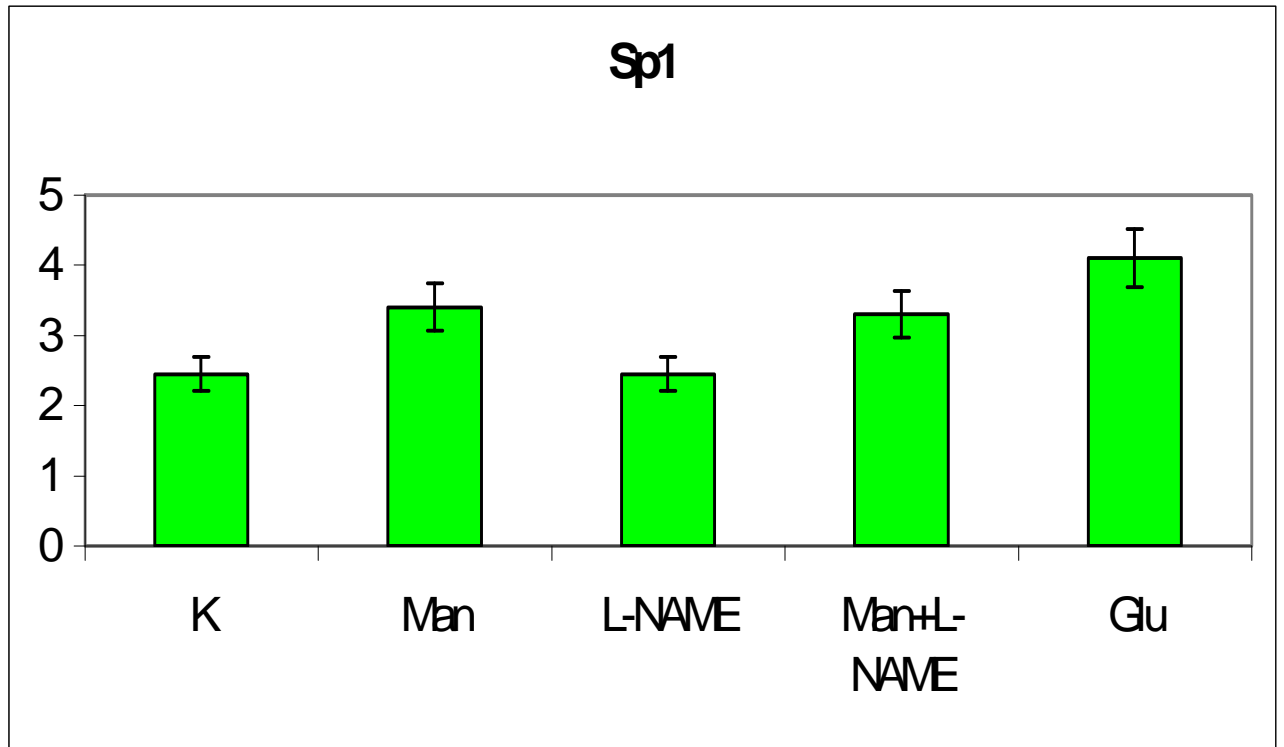
მოყვანილია A<sub>450</sub> მკვ ცილაზე.

აგრეთვე აღმოჩნდა, რომ უჯრედულ კულტურაში L-NAME-ს დამატება იწვევს STAT-ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის შემცირებას (სურათი 14), რაც მეტყველებს იმაზე, რომ NO-ს კონსტიტუციური დონე აუცილებელია STAT-ის მოქმედებისათვის. მანუმიცინის ცალკეული დამატება კულტურაში არავითარ ეფექტს არ ახდენს იმ დროს, როდესაც მოცემული ანტიბიოტიკი ხსნის L-NAME-თი გამოწვეული STAT-ის აქტივობის დნმ-თან დაკავშირების ინჰიბირებას.



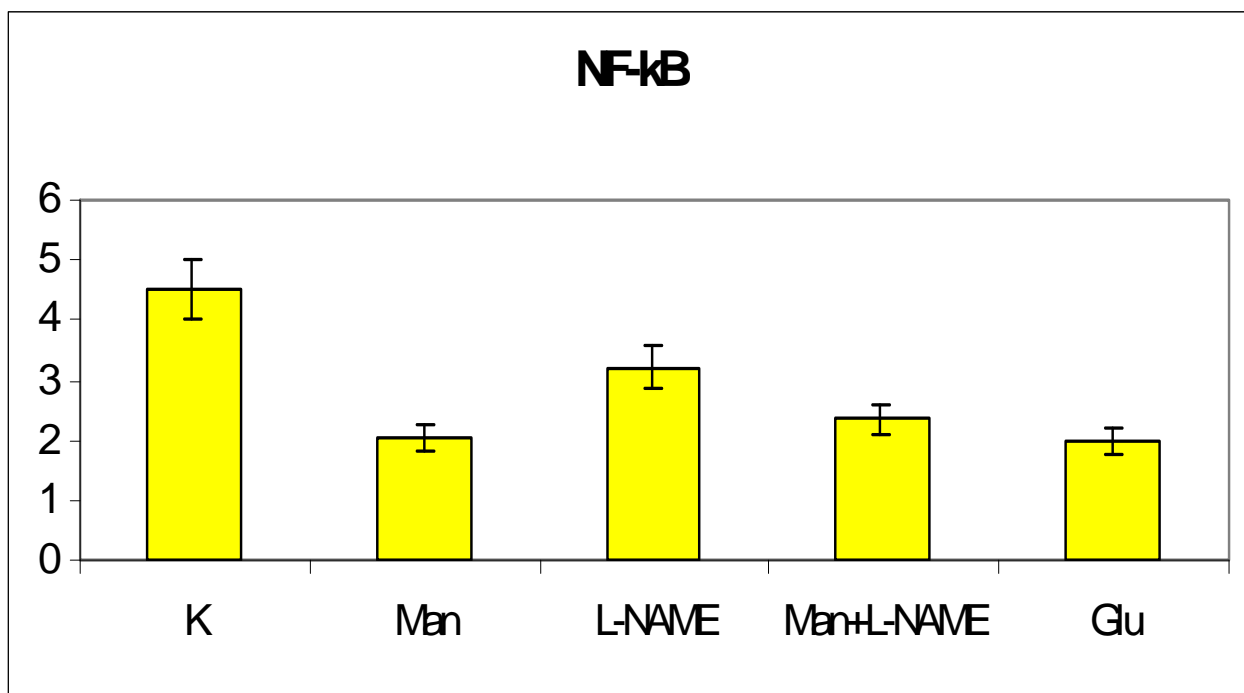
**სურათი 14. STAT-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10  $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია  $A_{450}$  მკვ ცილაზე.**

შემდგომ ექსპერიმენტებში დადგინდა, რომ L-NAME დამატება კულტურის საკვებ არეში ოდნავ ამცირებს Sp1 ტრანსკრიფციული ფაქტორის აქტივობას და მანუმიცინის თანაობისას ტრანსკრიპციული ფაქტორების დნმ-თან დაკავშირების აქტივობა აღდგება საკონტროლო დონემდე (სურათი 15).



სურათი 15. Sp1-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმინთან (10  $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A<sub>450</sub> მკვ ცილაზე.

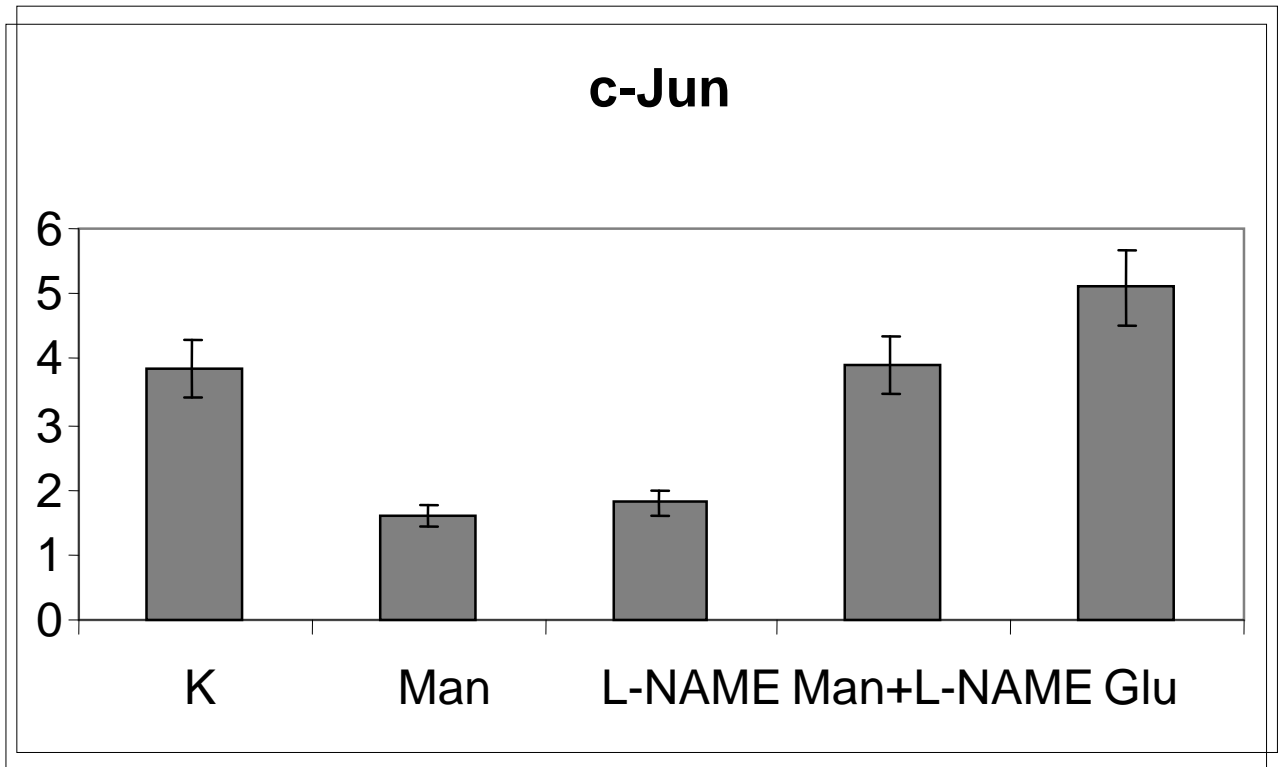
საინტერესოა ის ფაქტი, რომ L-NAME-ს მსგავსად მანუმინიც ამცირებს NF- $\kappa$ B-ს დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობას, რაც მიგვითითებს იმაზე, რომ NO-ს კონსტიტუციური დონე და ფარნეზილირებული Ras ცილის არსებობა აუცილებელია NF- $\kappa$ B-ფაქტორის ტრანსკრიფციული აქტივობისათვის (სურათი 16).



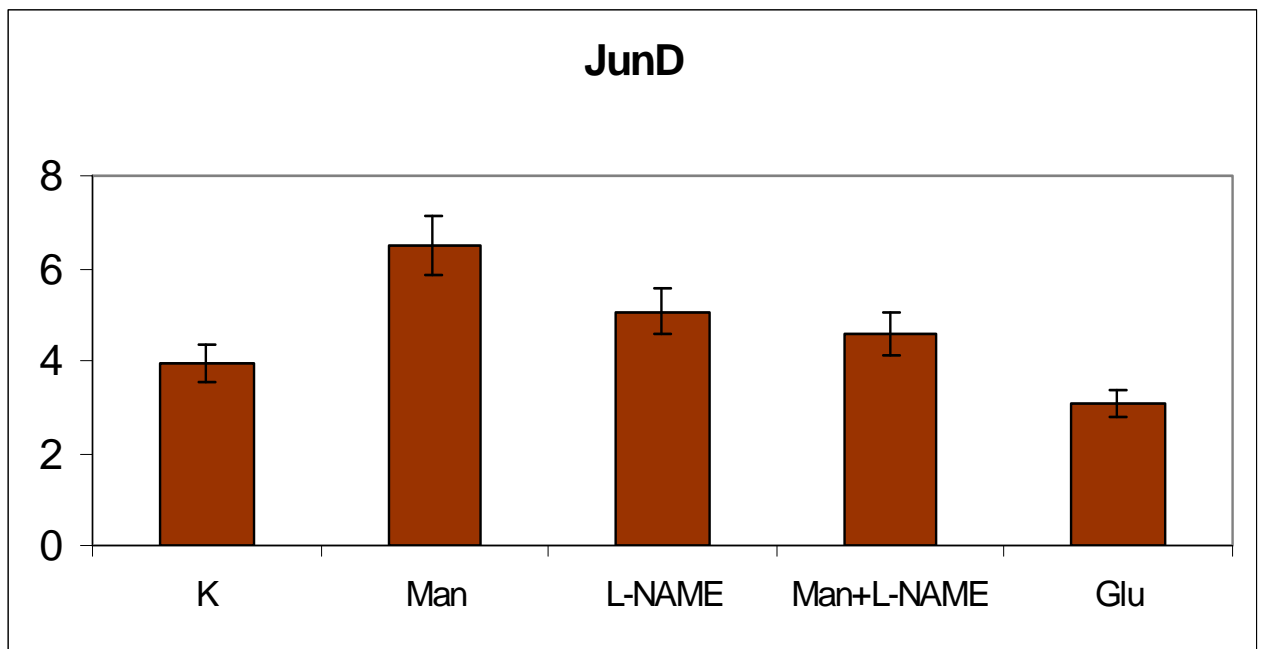
სურათი 16. NF-κB-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μM) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად

ექსპერიმენტების შემდგომ სერიაში გაირკვა მანუმიცინისა და L-NAME-ს დამთრგუნველი მოქმედება c-Jun-ის დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობაზე. საინტერესოა ის ფაქტიც, რომ მანუმიცინი და L-NAME თანადროული დამატებისას არ მოქმედებენ აღნიშნული ტრანსკრიფციული ფაქტორის აქტივობაზე (სურათი 17).

მეორეს მხრივ, აღმოჩნდა, რომ L-NAME ზრდის ATF-2-ის დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობას, ხოლო მანუმიცინი ხსნის L-NAME-ს გამააქტივებელ ეფექტს. ამგვარად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ATF-2-ფაქტორის აქტივაციას განაპირობებს დენიტროზილირებული და ფარნეზილირებული Ras პროტეინოცილა.



სურათი 17. c-Jun-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10  $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია  $A_{450}$  მკვ ცილაზე.



სურათი 18. JunD-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10  $\mu$ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია  $A_{450}$  მკვ ცილაზე.

შემდგომი კვლევის დროს დადგინდა, რომ მანუმიცინი ზრდის JunD-ს აქტივობას, ხოლო L-NAME ხსნის აღნიშნულ ეფექტს (სურათი 18). ზემოთაღნიშნული ფაქტორი მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს ნიტროზილირებულ და დეფარნეზილირებულ მდგომარეობაში. რაც შეეხება CREB ტრანსკრიფციულ ფაქტორს, მისი აქტივობის დონე უჯრედში ინჰიბიტორების ზეგავლენით სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს არ განიცდის.

ამ გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობა დამოკიდებულია NO-ს შიდაუჯრედულ დონეზე და ფარნეზილირებაზე. მიღებულმა შედეგებმა გამოავლინეს დადებითი კორელაცია ERK-ს და JNK ფოსფორილირებასა და ATF-2 და JunD-ს აქტივობას შორის და უარყოფითი კორელაცია JNK ფოსფორილირებასა და STAT-ის აქტივობას შორის. აღსანიშნავია, რომ Akt ფოსფორილირების ხარისხსა და განსაზღვრულ ტრანსკრიფციის ფაქტორებს შორის არანაირი სარწმუნო კორელაცია დადგენილი არ იყო.

ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემების თანახმად, აზოტის ოქსიდის მუდმივი დონე და ფარნეზილირების ინჰიბირება ცვლის ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობას. დადგინდა, რომ მანუმიცინით გამოწვეული ფარნეზილირების ინჰიბირება ამცირებს NF- $\kappa$ B-ს დნმ-თან დაკავშირების აქტივობას, არ ცვლის STAT, ATF-2, CREB, Sp1 დნმ-თან დაკავშირების აქტივობას და ზრდის c-Fos, JunD, c-Jun-ის აქტივობას. მოცემულ პირობებში Akt-ს ფოსფორილირების ხარისხი შემცირებულია, როცა ERK-ს ფოსფორილირება იზრდება და JNK ფოსფორილირება არ იცვლება. მოცემული შედეგები ადასტურებენ, იმას რომ PI3-კინაზა/Akt არის ძირითადი გზა, რომელიც სხვადასხვა გზით გადართავს სიგნალს უჯრედული გადარჩენიდან სიკვდილზე და პირიქით. იგი წარმოადგენს ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორის მთავარ სამიზნეს [Jiang 2000]. ნეირონებში Akt პროტეინკინაზა განაპირობებს აპოპტოზის უარყოფით რეგულაციას სიგნალ-რეგულირებული კინაზა-1-ის საშუალებით (ASK1), რაც ახდენს p38 და c-Jun გააქტივების პრევენციას თავის ტვინის ნეირონულ კულტურაში [Yamagishi 2003]. ამგვარად, Ras-ის ფარნეზილირების ინჰიბირებამ და შესაბამისად Akt-ს აქტივობის შემცირებამ შეიძლება გაააქტივოს c-Jun. ფაქტორი. მეორეს მხრივ, მანუმიცინით გამოწვეული c-Fos და JunD-ს დნმ-თან დაკავშირების გაძლიერება



კორელირებს ERK ფოსფორილირებასთან, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ მოცემული პროტეინკინაზა მონაწილეობს c-Fos-სა და JunD-ს გააქტივებაში. JunD, c-Jun და c-Fos ცილები ჩვეულებრივ წარმოადგენენ AP1 კომპლექსის კომპონენტებს და ეს კომპლექსი შეიცავს JunD და c-Fos, რომელთა აქტივობა იზრდება პროტეინფოსფატაზა 2A-ს დაინჰიბირების შედეგად [Cacocceveli 1998]. გარდა ამისა, JunD-ს და c-Fos-ის შემცველი AP1-ის გააქტივება მანუმიცინის თანაობისას ასახავს ERK დეფოსფორილირების დაინჰიბირებას. Ras-ცილის გარდა მანუმიცინის სამიზნე ამ შემთხვევაში შეიძლება იყოს PRL-ფოსფატაზების ოჯახი, რომლებიც ფარნეზილირების შემდეგ იცვლიან მათ ლოკალიზაციას ბირთვში [Zeng 2000]. საინტერესოა, რომ AP1-ის მეორე წევრის, JNK-ს სუბსტრატის – ATF-2-ის აქტივობა არ იცვლება უჯრედების მანუმიცინით დამუშავების შედეგად. ბალანსი ATF2-სა და c-Jun-ს შორის AP1-ში ნეირონული დიფერენცირებისა და სიკვდილის ალტერნატიულ გზებს შორის გადაწყვეტაში მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს და ძირითადად დამოკიდებულია JNK აქტივობაზე [Leppa 2001]. იმის საფუძველზე, რომ წინამდებარე ექსპერიმენტებში მანუმიცინ-დამოკიდებული JNK აქტივობის ცვლილება არ შეიმჩნეოდა, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ AP1 კომპლექსში ATF-2-ის აქტივობა არ იცვლება.

აგრეთვე დადგინდა, რომ მანუმიცინის მოქმედებით NF-κB დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა მცირდება, რაც მიუთითებს ფარნეზილირების, შესაძლოა შესაბამისად მეთილირების მნიშვნელობაზე, და Ras-ცილის მემბრანაში გადაადგილების აუცილებლობაზე NF-κB ბიოლოგიურ ფუნქციობისათვის. NF-κB-ს დნმ-დაკავშირების აქტივობის შემცირება კორელირებს Akt-ს პროტეინკინაზის ფოსფორილირების შემცირებასთან და არ კორელირებს JNK და ERK ფოსფორილირების ხარისხთან. NF-κB-ს ინჰიბიტორული ცილა – IκB შეიძლება ფოსფორილირდეს ERK და Akt პროტეინკინაზებით [Celeg 2004], მაგრამ ნეირონებში Ras/PI3/Akt გზა აუცილებელია NF-κB სრული გააქტივებისათვის [Lilienbaum, 2003]. ჩვენი მონაცემები სრულიად ეთანხმება ზემოთხსენებულ მონაცემებს.

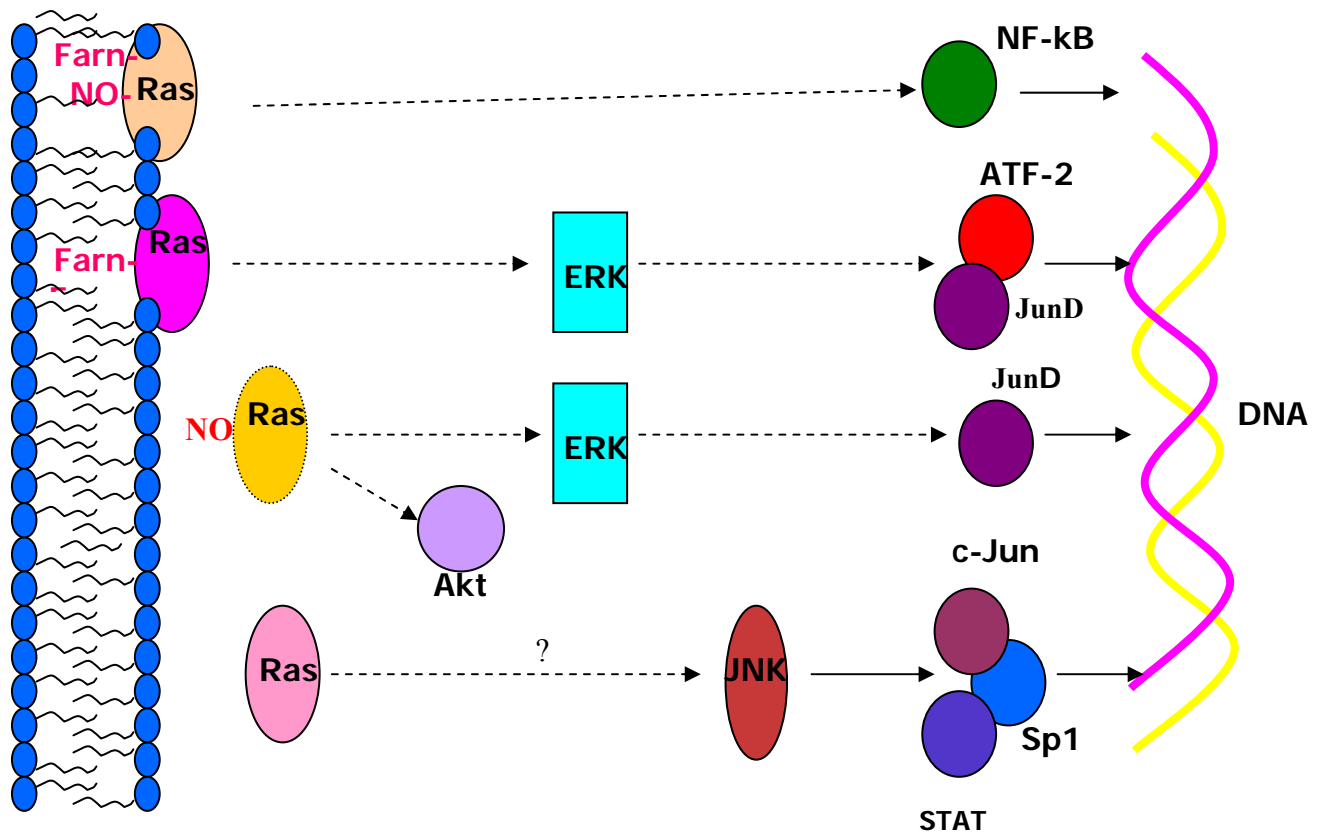
NNO შესაძლოა აგრეთვე მონაწილეობდეს ტრანსკრიფციის რედოქს კონტროლში ტრანსკრიფციის ფაქტორების დნმ-დაკავშირებული აქტივობის რეგულირების გზით, ისეთი, როგორც NF-κB [Mattews 1996], AP1 [Tabuchi 1994] და Sp1 [Zhang 2003]. ჩვენი

შედეგების თანახმად L-NAME-თი გამოწვეული NO-ს შიდაუჯრედული კონცენტრაციის შემცირება ზრდის c-Fos, ATF-2 და JunD აქტივობას და ამცირებს STAT, Sp1 და c-Jun-ის აქტივობას. ყველა ამ ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობა აღდგება ნორმალურ დონემდე მანუმიცინის არსებობის პირობებში, რაც მიგვითითებს იმაზე, რომ ცილის თანადროული ფარნეზილირება და ნიტროზილირება ცვლის Ras-ით კონტროლირებადი დადმავალი გზების მიმართულებას. მეტიც, c-Fos-ის და JunD დნმ-დაკავშირების აქტივობის გაზრდა ERK-ს ფოსფორილირებასთან ერთად აღინიშნება L-NAME-ს თანაობისას. L-არგინინის უჯრედული დონის პირობებში NO აინჰიბირებს ERK-ს აქტივობას Ras დამოკიდებული მექანიზმების გზით [Raines 2004]. ჩვენი ექსპერიმენტების მიხედვით L-NAME-ს თანაობისას ERK-ს ფოსფორილირების დონე გაძლიერდა, რაც ადასტურებს, რომ Ras-ის ნიტროზილირება აინჰიბირებს ERK-ს ფოსფორილირებას, რასაც შედეგად მოყვება AP1-ის გააქტივება. ამჟამად გაუგებარია რატომ არის პირდაპირ ჩართული ამ პროცესში Ras-ის ნიტროზილირება, მაგალითად, ცილები, რომელთა აქტივობაც S-ნიტროზილირებით რეგულირდება, გარდა Ras-ისა და JNK2 [So 1998].

როგორც უკვე ითქვა, Sp1 და Sp3 წარმოადგენენ თუთიის თითებიან Dდნმ-აქტივირებად ცილებს, რომლებიც მონაწილეობენ უჯრედისათვის დამახასიათებელი სპეციფიკური გენების ექსპრესიაში, რაშიც იგულისხმება აგრეთვე ლიგანდ-დაჭიმკრული იონური არხების სუბერთეულების მსგავსი რიგი ნეიროსპეციფიკური გენების ტრასკრიფციული რეგულაცია [Melnikova 2001, Mao 2002]. ოქსიდაციური სტრესი მნიშვნელოვნად ზრდის Sp1 და Sp3 ცილების დონესა და დნმ-თან დაკავშირებას და Sp1 და Sp3 გაძლიერებული ექსპრესია აძლიერებს ქერქის ნეირონების გადარჩენას [Ryu 2003]. ორივე, Ras დამოკიდებული ERK-სა და PI3-კინაზა/Akt გზები გადამწყვეტია Sp1 და Sp3 ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობის გაზრდისთვის [Melnikova 2001]. ჩვენი შედეგები ზუსტად ეთანხმება ამ მონაცემებს, რადგან მხოლოდ L-NAME ამცირებს Sp1-ის დნმ-დაკავშირების აქტივობას და ეს შემცირება კორელირებს Akt-ს აქტივობის კლებასთან. მეორე ტრანსკრიფციული ფაქტორი, რომლის აქტივობაც ვარდება L-NAME-ს მოქმედებით, არის STAT-1. JAK-სიგნალის გადამცემები და ტრასკრიფციის სიგნალის აქტივატორები (JAK-STAT) წარმოადგენს ანთებითი პროცესების მიმდინარეობის

ძირითად გზას, რომელსაც მივყავართ ზოგიერთი ანთებასთან დაკავშირებული გენების ექსპრესიასთან [Darnell, 1997]. STAT არის ლატენტური ციტოპლაზმური ტრანსკრიფციული ფაქტორი, რომელიც აქტივდება მისი რეცეპტორულ კომპლექსთან ასოცირების შედეგად. ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში JAK STAT ანთებითი სიგნალი შუამავლობს განგლიოზიდებით სტიმულირებადი მიკროგლიის გააქტივებაში და შედეგად იწვევს ERK-ს ფოსფორილირებას, რაც მიუთითებს JAK და ERK გზების გადაკვეთაზე [Kim 2002]. მეტიც, JAK პირდაპირ ჩართულია Pyk2-კინაზით სტიმულირებული Ras-MAPK გზის გააქტივებაში და იწვევს c-fos და c-myc გენების ჩართვას [Miyazaki 1998]. პირველად გლია-ნეირონულ პრეპარატებში მანუმინი არ ცვლის STAT აქტივობას, მაგრამ აღადგენს L-NAME-თი გამოწვეულ ეფექტს.

ზემოთაღნიშნული მონაცემების თანახმად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორის აქტივობა იცვლება აზოტის ოქსიდის დონის ცვლილებისა და ფარნეზილირების ინჰიბირების შედეგად. მიღებული შედეგები მნიშვნელოვან საფუძველს წარმოადგენს შემდგომი კვლევისათვის, რომელიც ბოლომდე გაარკვევს Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების როლს დადამავალი სასიგნალო კასკადების სპეციფიკურობაზე და ფიზიოლოგიურ პასუხზე და დაადგენს მისი რეგულაციის სავარუდო მოლეკულურ მექანიზმებს.



სქემა 1. ნიტროზილირების და ფარნეზილირების გავლენა Ras-ის დადამავალი სასიგნალო გზების სპეციფიკურობაზე

დასვენები:

1. Ras-პროტონკოცილის GTP-აზური აქტივობა რეგულირდება მისი პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციებით, კერძოდ, ფარნეზილირებით და ნიტროზილირებით.
2. ციტოპლაზმური (დეფარნეზილირებული) Ras-ცილის ნიტროზილირება იწვევს GTP-აზური აქტივობის მნიშვნელოვან სტიმულაციას, ხოლო ფარნეზილირება ახდენს მის ინჰიბირებას.

3. მემბრანული (ფარნეზილირებული) Ras-ცილის ნიტროზილირება იწვევს მისი GTP-აზური აქტივობის დაქვეითებას, რაც შესაძლებელია აიხსნას მოდიფიკაციის განსხვავებული საიტის არსებობით.
4. ფარნეზილირების და ნიტროზილირების საშუალებით მიმდინარეობს დადმავალი პროტეინკინაზების ჯვარედინი რეგულაცია; კერძოდ, ნიტროზილირებული და ფარნეზილირებული Ras ცილა ააქტივებს Akt კასკადს, ხოლო ERK-ს აქტივაციას ადგილი აქვს ფარნეზილირების ან ნიტროზილირების დაქვეითების შემთხვევაში. აღსანიშნავია, რომ JNK პროტეინკინაზას აქტივობა იმატებს ნიტროზილირების ინჰიბირების პირობებში.
5. მემბრანაში ჩართული ფარნეზილირებული და ნიტროზილირებული Ras-ის ძირითადი ეფექტორია ტრანსკრიფციის ფაქტორი NF-kB. მემბრანაში ჩართული, მაგრამ არანიტროზილირებული Ras-ის ძირითადი ეფექტორები არიან ATF-2 და JunD.
6. ციტოპლაზმური ნიტროზილირებული Ras-ის ძირითად დადმავალ სამიზნეს წარმოადგენს JunD, ხოლო ციტოპლაზმური არამოდიფიცირებული Ras-ის ძირითად ეფექტორს წარმოადგენენ c-Jun, STAT და Sp1; ციტოპლაზმური Ras-ის სწრაფი ნახევარდაშლის პერიოდის გამო ამ ტრანსკრიფციული ფაქტორების გააქტივებას ტრანსკრიფციული ხასიათი უნდა ჰქონდეს.
7. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Ras-ცილის ფარნეზილირება და ნიტროზილირება განაპირობებს მისი GTP-აზური აქტივობის რეგულაციას და დადმავალი ეფექტორების სპეციფიკურობის შეცვლას.

### გამოყენებული ლიტერატურა

1. Aktories K., Rosener S., Blaschke U. and Chatwal G.S. **Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes.** *European Journal of Biochemistry* 1988,172:445–450.

2. Albert S and Gallwitz D. **Two new members of a family of Ypt/Rab GTPase activating proteins. Promiscuity of substrate recognition.** *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 33186–33189.
3. Alister c. Ward, Ivo Touw and Akihiko Yoshimora. **The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis.** *Blood* 2000, 95(1): 19-29;
4. Altschuler D and Lapetina EG. **Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b.** *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 7527–7531.
5. Altschuler DL and Ribeiro-Neto F. **Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b.** *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 1998; 95: 7475–7479
6. Baeuerle P.A., Baltimore D., **NF- $\kappa$ B: Ten years after,** *Cell*, 1995; 87, 13-20.
7. Baker T.A., Booden M.A., Buss J.E. **S-Nitrosocysteine Increases Palmitate Turnover on Ha-Ras in NIH 3T3 Cells.** *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275,22037-22047.
8. Barbacid M., **ras genes.** *Annual Reviews Biochem.* 1987, 5: 779-827.
9. Barbakadze T, Zhuravliova E, Sepashvili M, Zaalishvili E, Ramsden J., Bator J, Szeberenyi J, Mikeladze D. **Production of homocysteine in serum-starved apoptotic PC12 cells depends on the activation and modification of Ras.** *Neuroscience Letters*, 2005, 391(1-2):56-61.
10. Bar-Sagi D, Hall A, **Ras, and Rho GTPases: a family reunion,** *Cell* 2000, 353, 103 227–238.
11. BD Mercury™ TransFactor Kits User Manual. Protocol PT3594-1 (PR2Y114). Published 10/30/2002.
12. Berezovski M., Li. W.P., Poulter C.D., Krylov S.N. **Measuring the activity of farnesyltransferase by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.** *Electrophoresis*, 2002, 23 3398-3403.
13. Bing-Chang Chen, Wen-Tung Wu, Feng-Ming Ho, and Wan-Wan Lin **Inhibition of Interleukin-1 $\beta$ -induced NF- $\kappa$ B Activation by Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Occurs through Akt Activation Associated with Interleukin-1 Receptor-associated Kinase Phosphorylation and Uncoupling of MyD88\*** *Journal of Biological Chemistry.* 2002, 277 (27): 24169-24179.
14. Bo Cen, Ahalya Selvaraj, Rebecca C. Burgess, Johann K. Hitzler, Zhigui Ma, Stephan W. Morris, and Ron Prywes **Megakaryoblastic Leukemia 1, a Potent Transcriptional Coactivator for Serum Response Factor (SRF), Is Required for Serum Induction of SRF Target Genes** *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23 (18): 6597-6608.

15. Booden M. sakaguchi D.S., Buss J.E. **Mutation of Ha-Ras C terminus changes effector pathway utilization.** *Journal of Biological Chemistry.* 2000, 275: 23559-23568.
16. Bos J.L. **ras oncogenes in human cancer: a review.** *Cancer* 1989, 89: 1567-1573.
17. Bowen C., Moses E.L., Tolentio P.J. and Walker M. **Metabolites of haloperidol display preferential activity at  $\sigma$ -receptors compared to dopamine D2 receptors.** *European Journal of Pharmacology* 1990; 117: 111-118.
18. Bredel M., Pollack I.F. **The p21-Ras signal transduction pathway and growth regulation in human high-grade gliomas.** *Brain Research Reviews* 1999; 29: 232-249.
19. Brown R., Marshall C.J., Pennie S.G. and Hall A. **Mechanism of activation of an N-Ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080.** *EMBO Journal* 1984; 3: 1321–1326.
20. Burns M.E., Sasaki T, Takai Y. and Augustine G.J. **Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic.** *Journal of Gen Physiol* 1998;111: 243–255.
21. Buss JE, Sefton BM. **Direct identification of palmitic acid as the lipir attached to p21ras.** *Mol. Cell. Biol.* 1986, 6, 116-122;
22. Caccavelli L., Manfroid I., Martial JA., Muller M. **Transcription Factor AP1 Is Involved in Basal and Okadaic Acid-Stimulated Activity of the Human PRL Promoter.** *Molecular Endocrinology* 1998. 12 (8): 1215-1227,
23. Casalino Laura, Dario De casare and Pasquale Verde. **Accumulation of Fra-1 in ras-Transformed Cells Depends on Both Transcriptional Autoregulation and MEK-Dependent Posttranslational Stabilization.** *Molecular and Cellural Biology* 2003, 23(12); 4401-4415.
24. Celec P. **Nuclear factor kappa B - molecular biomedicine:the next generation.** *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004, 58: 365–371.
25. Cheatham B. & Kahn C.R. **Insulin action and the insulin signaling network** *Endocrinological Review* 1995, 16: 117- 142.
26. Chen Z., Otto J. C., Bergo M. O., Young S. G., Casey P. J., **The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interacion between K-Ras and microtubules.** *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 41251-41257
27. Crespo<sup>a</sup> P. and Leon<sup>b</sup> J.. **Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation.** *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 2000, 57: 1613-1636.
28. Darnell J. E., **STATs and gene regulation,** *Science,* 1997; 277, 1630-1635

29. Der C.J., Krontiris T.G. and Cooper G.M. **Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the Ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses.** *Proc. Natl. Academy Science USA* 1982; 79: 3637–3640.
30. deVries J.E., tenKate J., Bosman F.T. **p21<sup>Ras</sup> in carcinogenesis.** *Pathology Research Pract.* 1996, 192: 7658-68;
31. Draznin B., Chang L., Leitner J., Takata Y. and Olefsky J.M. **Insulin activates p21Ras and guanine nucleotide releasing factor in cells expressing wild type and mutant insulin receptors.** *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 19998-20001.
32. Esteban L. M., Vicario-Abejon C., Fernandez-Salguero P., Fernandez-Medarbe A., Swaminathan N., Yenger K., Lopez E., Malumbers M., McKay R., Ward J M., Pellicer A., Santos E., **Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development.** *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21, 1444-1452
33. Finkbeiner, S. & Greenberg, M. E. **Ca(2+)-dependent routes to Ras: mechanisms for neuronal survival, differentiation, and plasticity?** *Neuron* 1996, 16, 233-236;
34. Frame S. and Balmain A. **Integration of positive and negative growth signals during Ras pathway activation in vivo.** *Current Opinion in Genetics & Development* 2001; 10: 106-113.
35. Garcia, A. M., Rowell, C., Ackermann, K., Kowalczyk, J.J., and Lewis, M. D **Peptodomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells.** *Journal of Biological Chemistry* . 1993, 268: 18415-18418.
36. Garrington TP, Johnson GL. **Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways.** *Current. Opinion. Cell Biol.*, 1999, 11: 211–218.
37. Ghosh S. and Baltimore D. **Activation in vitro of NF-kB by phosphorylation of its inhibitor Ikb $\beta$** . *Nature*, 1990, 344(6267): 678-82.
38. Goalstone M. L., & Draznin B. **CELL BIOLOGY AND METABOLISM: Effect of Insulin on Farnesyltransferase Activity in 3T3-L1 Adipocytes** *Journal of Biological Chemistry* 1996, 271, 27585-27589;
39. Goalstone M. L., Natarajan R., Standley P. R., Walsh M. F., Leitner J. W. **Insulin-glucagon-GI peptides – diabetes mellitus: Insulin Potentiates Platelet-Derived Growth Factor Action in Vascular Smooth Muscle Cells.** *Endocrinology in press* 1998; 139: 4067.



40. Goalstone M., Leitner J. W. & Draznin B. **GTP loading of farnesylated p21Ras by insulin at the plasma membrane.***Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997, 239: 42-45.
41. Graves JD, Downward J, Izquierdo-Pastor M, Rayter S, Warne PH, and Cantrell DA. **The growth factor IL-2 activates p21ras proteins in normal human T lymphocytes** *J. Immunol.*, 1992; 148: 2417.
42. Gupta S., Campbell, D., Derijard, B. and Davis R.J. **Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway.** *Science* 1995, 267: 389–393.
43. Haluska<sup>a</sup> P., Dy G.K., Adjei A.A.. **Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents.** *European Journal of Cancer* 2002, 38 :1685-1700.
44. Hamilton M., Liao J., Cathcart M. K., Wolfman A., **Constitutive association of c-N-Ras with Raf-1 and PKC in latent signalling modules.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 29079-29090.
45. Hamilton M., Wolfman A., **Ha-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo.** *Oncogene* 1998, 16: 1417-1428.
46. Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J., **All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated.** *Cell* 1989, 57: 1167-1177.
47. Hart M.J, Shinjo K, Hall A, Evans T, and Cerione RA **Identification of the human platelet GTPase activating protein for the CDC42Hs protein.** *Journal of Biological Chemistry* 1991, 266: 20840 - 20848.
48. Hawes B.E., Van Biesen T., Koch W.J., Luttrell L.M. and Lefkowitz R.J. **Distinct pathways of Gi - and Gq -mediated mitogen-activated protein kinase activation.** *Journal of Biological Chemistry*, 1995; 270: 17148–17153.
49. Herrera R., Sebolt-Leopold J.S.. **Unraveling the complexities of the Raf/MAP kinase pathway for pharmacological intervention.** *Trends in Molecular Medicine* 2002, 8 (4) 27-31.
50. Hess, D. T., Patterson, S. I., Smith, D. S., and Skene, J. H.P. **Neuronal growth cone collapse and inhibition if protein fatty acylation by nitric oxide.** *Nature* 1993, 366: 562-565.
51. Hoon Ryu, Junghee Lee, Khalequz Zaman, James Kubilis, Robert J. Ferrante, Brian D. Ross, Rachael Neve and R. Ratan. **Sp1 and Sp3 Are Oxidative Stress-inducible, Antideath Transcription Factors in Cortical Neurons.** *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(9):3697;

52. Hoshi M, Nishida E and Sakai H **Activation of a Ca<sup>2+</sup> inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors phorbol esters, and serum in quiescent cultured human.** *The Journal of Biological Chemistry* 1988; 263: 5396 - 5401
53. Hunter t., Karin M., **The regulation of transcription,** *Cell*, 1992, 70: 375-387 ;
54. Inoue. J.- I., Kerr, L. D., Kakizuka, A., and Verma, I.M.: „**I $\kappa$ B- $\gamma$ , a 70kDa protein identical to the C-terminal half of p110 NF- $\kappa$ B; a new member of the I $\kappa$ B family**” *Cell*, 1992, 68(6): 1109-20.
55. Irena n. Melnikova and Paul D. Gardner. **The Signal Transduction Pathway Underlying Ion Channel Gene Regulation by Sp-1-c-Jun Interactions.** *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276, (22) 19040-19045.
56. James G. L., Goldstein J. L., Brown M. S., **Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro.** *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 6221-6226.
57. James, G. L., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Rawson, T. E., Somers, T. C., McDowell, R. S., Crowley, C. W., Lucas, B. K., Levinson, A. D. and Masters, J. C., Jr. **Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells.** *Science*. 1993, 260: 1937-1942.
58. Jiang K., Coppola D., Crespo NC., Nicosia SV., Hamilton AD., Sefti S.M., Cheng J.O. **The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis.** *Moll. Cell. Biol.* 2000, 20: 139-148.
59. Jmanoff H., Edelman W., Pellicer A., Kucherlapati R., **The murine N-Ras gene is not essential for growth and development.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92: 1709-1713
60. Jones M. K., Jackson J. H., **Ras-GRF activates Ha-Ras, but not N-Ras or K-Ras 4B, protein in vivo.** *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 273: 1782-1787
61. Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B. and Bauerle, P. A., „**Stimulation of ionotropic glutamate receptors activates transcription factor NF- $\kappa$ B in primary neurones,**” *Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 9618-9622;
62. Keiko Ikeda, Tatsushi Onaka, Makoto Yamakado, Junichi Nakai, Tomo-o Ishikawa, Makoto M. Taketo, and Kiyoshi Kawakami, **Degeneration of the Amygdala/Piriform Cortex and Enhanced Fear/Anxiety Behaviors in Sodium Pump  $\alpha$ 2 Subunit (Atp1a2)-Deficient Mice** *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23(11): 4667-4676.

63. Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K., Pandey P., Kaneki M., Wang Q., Cheng K., Chen Y. N., Campbell A., Sudha T., Yuan Z. M., Narula J., Weichselbaum R., Nalin C., Kufe D., **Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage.** *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 322-327.
64. Khol, N. E., Mosser, S.D., deSolms, S. J., Gullani, E. A., Pompliano, D. L., Grham, S. L., Smith, R. L., Scolnick, E. M., Oliff, A. and Gibbs, J. B. **Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor.** *Science* 1993, 260: 1934-1937.
65. Kikuchi, A. et. al. **ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21.** *Molecular and Cellular Biology* 1994, 14: 7483-7491.
66. Kim OS, Park EJ, Joe E-h, Jou I. **JAK-STAT Signaling Mediates Gangliosides-induced Inflammatory Responses in Brain Microglial Cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 40594-40601.
67. Lander H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. F., Levi, R. & Novogrodsky, A. **p21Ras a Common Signaling Target of Reactive Free Radicals and Cellular Redox Stress** *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 7017-7020.
68. Lander H.M., Jacovina A.T, Davis R.J. and Tauraset J.M. **Differential Activation of Mitogen-activated Protein Kinases by Nitric Oxide-related Species** *The Journal of Biological Chemistry* 1996, 271: 19705.
69. Lander, H. M., Hajjar, D. P., Hempstead, B. L., Mirza, U. A., Chait, B. T., Campbell, S. & Quilliam, L. A., **A Molecular Redox Switch on p21<sup>ras</sup>. structural basis for the nitric oxide-p21<sup>ras</sup> interaction** *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 272: 4323-4326.
70. Lander, H. M., Milbank, A. J., Tauras, J. M., Hajjar, D. P., Hempstead, B. L., Schwartz, G. D., Kraemer, R. T., Mirza, U. A., Chait, B. T., Burk, S. C. and Quilliam, L. A. **Redox regulation of cell signalling.** *Nature* 1996, 381: 380-381.
71. Leitner J. W., Kline T., Carel K., Goalstone M. & Draznin B. *Endocrinology* 1977, 138, 2211-2214;
72. Leon J., Cuerrero I. and Pellicer A. **Differential expression of the ras gene family in mice.** *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7: 1535-1540.
73. Leppä S, Eriksson M, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. **Complex Functions of AP-1 Transcription Factors in Differentiation and Survival of PC12 Cells.** *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21: 4369-4378.

74. Li L., Feng Z. and Porter A.G. **JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on serine 63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2004;279: 4058.
75. Lilienbaum A., Israel A. **From Calcium to NF-kB Signaling Pathways in Neurons** *Molecular and Cellular Biology* 2003, 23(8): 2680–2698.
76. Lowry, O.H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr, and Rose J. Randall, **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *Journal of Biological Chemistry* 1951, 193: 265-275.
77. Lowy D.R. and Willumsem B. M. **Function and regulation of ras.** *Annu. Rev. Biochem.* 1993, 62: 851-891.
78. Magee A.I., Newman C.M., Giannakouros T., Hancock J.F., Fawell E. and Aarmstrong J. **Lipid modifications and function of the Ras superfamily of proteins.** *Biochemical Soc. Trans.* 1992; 20: 497–499.
79. Magee T. and Marshall C.J. **New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane.** *Cell* 1999, 98: 9-12.
80. Maginn Elaina. **Transactivation of Gene Expression by Inducible Transcription Factors.** *Journal of Biological Chemistry* 2001; 67:24407-24412.
81. Mallis R.G., Buss J.E., Thomas J.A. **Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines.** *Biochem J.* 2001, 355(1): 145-153.
82. Mallis, R. J., and Thomas, J. A. **Effect of S-nitrosothiols on celllural glutathione and reactive protein sulfhydryls.** *Arch. Biochem. Biophys* 2000, 383: 60-69.
83. Maltese WA. **Posttranslational modification of proteins by isoprenoids in mammalian cells.** *Faseb J.* 1990, 4, 3319- 3328.
84. Malumbers M. and Pellicer A. **RAS pathways to cell cycle control and cell transformation.** *Front. Biosci.* 1998, 3: d887-d912.
85. Manabe T., Aiba A., Yamada A., Ichise T., Sakagami H., Kondo H. and Katsuki M, **Regulation of long-term potentiation by H-Ras through NMDA receptor phosphorylation.** *Journal of Neuroscience* 2000; 2504-2511.
86. Mao X, Moerman AM, Barger SW. **Neuronal kB-binding Factors Consist of Sp1-related Proteins. Functional implications for autoregulation of N-methyl-D-aspartate receptor-1 expression.** *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277: 44911–44919.
87. Marc L., Goalstone J., Leitner W., Wall K., Dolgonos L., Rother K. I., Accili D., Draznin B. **Effect of Insulin on Farnesyltransferase.** *Jurnal of Biological Chemistry* 1998, 37: 22892-22896.

88. Mark p. mattson, Carsten Culmsee, ZaiFang Yu and Simonetta Camandola. **Roles of Nuclear factor kB in neuronal Survival and Plasticity.** *Journal of Neurochemistry* 2000, 74: 443-456.
89. Masure S, Haefner B., Wesselink J.-J., Hoefnagel E., Mortier E., Verhasselt P., Tuytelaars A., Gordon R. and Richardson A. **Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3** *European Journal of Biochemistry* 1999; 265: 353-360.
90. Matthews J. R., Botting C. H., Panico M., Morris H. R., Hay R. T. **Inhibition of NF- $\kappa$ B DNA binding by nitric oxide.** *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24: 2236-2242.
91. Mazieres J., Pradines A., Favre G. **Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy.** *Cancer Letters* 2004, 206: 159–167.
92. Melnikova IN, Gardner PD. **The Signal Transduction Pathway Underlying Ion Channel Gene Regulation by Sp1-c-Jun Interactions.** *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 19040–19045.
93. Meng F., Liu L., Chin P. and D’Mello S.R. **Akt is a downstream target of NF- $\kappa$ B.** *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 29674-29680.
94. Miyamoto M. Murphy T., Schnaak R. L. & Coyle J. T. **Antioxidants protects against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line.** *Journal of Pharmacology and Neurochemistry* 1989; 67: 1965-1973.
95. Miyazaki T, Takaoka A, Nogueira L, et al. **Pyk2 is a downstream mediator of the IL-2 receptor coupled Jak signaling pathway.** *Genes Dev.*, 1998,12: 770-775.
96. Moores SA. L. Schaber M. D. , Mosser S. D. , Rands E., O’Hara M. B. **Sequence dependence of protein isoprenylation** *Journal Biological Chemistry* 1991, 266: 14603 - 14610
97. Mott, H.R., Carpenter, J.W. Campbell, SL. **Structural and functional analysis of a mutant Ras protein that is insensitive to nitric oxide activation.** *Biochemistry* 1997, 36: 3640–3644.
98. Okubo Y., Blakesley V.A., Stannard B., Gutkind S. and Le Roith D. **Insulin-like growth factor-1 inhibits the stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase.** *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 25961-25966.
99. Olefsky J. M. **The insulin receptor. A multifunctional protein** *Diabetes* 1990, 39: 1009-1016.
100. Olson MF, Marais R. **Ras protein signalling.** *Semin.Immunol.* 2000, 12: 63-73.

101. Overmeyer. J. H. et. al. **The putative Switch 2' domain of the Ras related GTP-ase. Rab1B plays an essential role in the interaction with Rab escort protein.** *Mol. Biol. Cell.* 1998, 9: 223-225.
102. Paul J. **Roles of oncogenes in cancerogenesis.** *Theories of Cancerogenesis 1986;* 145-160.
103. Pei, E. F., Kregel, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W. and Wittinghofer, A. **Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis.** *EMBO J.* 1990, 9: 2351-2359.
104. Pennisi E. **Superoxides relay Ras protein's oncogenic message.** *Science.* 1997;275:1567-1568.
105. Peruzzi F., Prisco M., Morrione A., Valentinis B., Baserga R., **Anti-apoptotic signaling of the IGF-1 receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4.** *Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276: 25990-25996.
106. Raines KW., Cao G-L., Porsuphatana S., Tsai P., Rosen GM., Shapiro P. **Nitric Oxide Inhibition of ERK1/2 Activity in Cells Expressing Neuronal Nitric-oxide Synthase.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, 279(6): 3933-3940.
107. Rebollo A. and A-C Martines. **Ras proteins: recent advances and new functions.** *Blood* 1999; 94: 2971-2980.
108. Rebollo A., Perez-Sala D., Martinez-A C., **Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: implications in prevention of apoptosis.** *Oncogene* 1999,18: 4930- 4939.
109. Reusch J., Bhuripanyo P., Carel K., Leitner W., Hsich P., DePaolo D. and Draznin B. **Differential requirement for p21Ras activation in the metabolic signaling by insulin.** *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270:2036-2040.
110. Ridley A.J., Paterson H.F., Johnston C.L., Diekmann D. and Hall A. **The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.** *Cell* 1992; 70: 401-410.
111. Rosen, L. B. & Greenberg, M. E. **Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels** *Proc. Natl. Acad. Set. USA* 1996, 93: 1113-1118.
112. Ryu H., Lee J., Zaman K, Kubilis J, Ferrante RJ, Ross BD, Neve R, Ratan RR. **Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons.** *Journal Neuroscience,* 2003, 23: 3597-3606.

113. Samdani A.F., Dawson V.L.& Dawson T.M., **Nitric Oxide Synthase in Models of Focal Ischemia** *Stroke.*,1997,28,1283-1288
114. Santillo M., Mondola P., Seru R., Annella T., Cassano S., Ciullo I., Tecce M. F., Iacomino G., Damiano S., Cuda G., Paterno R., Martignetti V., Mele E., Feliciello A., Avvedimento E. V., **Opposing functions of Ki- and Ha-Ras genes in the regulation of redox signals.** *Curr. Biol.* 2001, 11: 614-619.
115. Satoru Yamagishi. **Apoptosis-Signal Regulating Kinase-1 in the Low Potassium-Induced Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun in Cultured Cerebellar Granule Neurons.** *J. Biochem.* 2003, 133: 719-724.
116. Saya Nakagomi. **Expression of the Activating Transcription Factor 2 Prevents c-Jun N-Terminal Kinase-Induced Neuronal Death by Promoting Heat Shock Protein 27 Expression and Akt Activation.** *The Journal of Neuroscience*, 2003, 23 (12): 5187-5196.
117. Schinder C., Darnell J. E., **Transcriptional responses to polypeptide ligands: the Jak-STAT pathway.** *Annu.Rev.Biochem.*, 1995, 64. 621-651.
118. Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C.J. **Understanding ras: it ain't over 'till it's over'.** *Trends Cell Biol.* 2000, 10: 147-154.
119. Shih T.Y., Williams D.R., Weeks M.O., Maryak J.M., Vass W.C. and Scolnick E.M.. **Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses.** *Journal of Virology* 1978; 27: 45–55.
120. Sinensky M, Lutz RJ. **The prenylation of proteins.** *Bioessays* 1992, 14: 25-31.
121. So H. S., Park R. K., Kim M. S., Lee S. R., Jung B. H., Chung S. Y., Jun C. D., Chung H. T. **Nitric oxide inhibits c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) via S-nitrosylation.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 247: 809-813.
122. Straus K, Lichter A, Lippman M, Danforth D, Swain S, Cowan K, deMoss E, MacDonald H, Steinberg S, and d'Angelo T **Results of the National Cancer Institute early breast cancer trial.** *J Natl Cancer Inst Monographs*, 1992; (11): 27-32.
123. Sweatt J.D. **The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory.** *Journal of Neurochemistry* 2001; 76: 1-10.
124. Tabuchi A., Sano K., Oh E., Tsuchiya T., Tsuda M. **Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1.** *FEBS Lett.*, 1994, 351: 123-127.

125. Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A. and Kawata M. **Small GTP-binding proteins.** *Int. Review of Cytology* 1992; 133: 187–230.
126. Takai Y., Sasaki T. and Matozaki T. **Small GTP-binding Proteins.** *Physiological Reviews* 2001, 81 (1): 153-189.
127. Teng K.K., Esposito D.K., Schwartz G.D. et al. **Activation of c-Ha-Ras by Nitric Oxide Modulates Survival Responsiveness in Neuronal PC12 Cells .** *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 37315-37320.
128. Thomas, J. A., Poland, B. and Honzatko, R. **Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation.** *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 319, 1-9.
129. Todd A. McBride **Stretch-activated ion channels and c-fos expression remain active after repeated eccentric bouts.** *J Appl Physiol* 2003, 94 (6), 2296-2302.
130. Treisma R. **Regulation of transcription by MAP kinase cascades.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996, 8: 205-215.
131. Trivier E., De Cesare D., Jacquot S., Pannetier S., Zackai E., Young I., Mandel J., Sassone-Corsi P. and Hanauer A. **Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrom.** *Nature* 1996; 384: 567-570.
132. Vogt A., Qian Y., Blaskovich M. A., Fossum R. D., Hamilton A. D. & Sefti S. M. **A Non-peptide Mimetic of Ras-CAAX: Selective Inhibition of Farnesyltransferase and Ras Processing** *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270: 660-664.
133. Voice J. K., Klemke R. L., Le A., Jackson J. H., **Four human ras homologs differ in their ability to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility.** *Journal of Biological Chemistry.* 1999, 274: 17164-17170.
134. Vojtek A.B., Hollenberg S.M. and Cooper J.A. **Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf.** *Cell* 1993; 74: 205–214.
135. Williams J.G., Pappu K. and Campbell S.L **Structural and biochemical studies of p21<sup>Ras</sup> S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange.** *PNAS* 2003, 100(11): 6376-6381.
136. Willumsen, B. M., Cox, A. D., Solski, P. A., Der, C. J. and Buss, J. E. **Novel determinant of H-ras plasma membrane localization and tranformation.** *Oncogene* 1996, 13: 1901-1909.
137. Wittinghofer A. and Pai E. **The structure of Ras protein: amodel for a universal molecular switch.** *Trends Biochem. Sci.* 1991, 16: 382-387.



138. Wolfman C., Palmby Todd, Channing J. Der, 2,3 and Alan Wolfman. **Cellular N-Ras Promotes Cell Survival by Downregulation of Jun N-Terminal Protein Kinase and p38 Janice.** *Molecular and Cellular Biology*. 2002, 22(5): 1589-1606 .
139. Wolfman J. C., Wolfman A., **Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal.** *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 19315-19323.
140. Xie Q. W., Kashiwahara Y., and Nathan, C.,**Role of transcription factor NF-kB/Rel in induction of nitric oxide synthase”.** *Journal of Biological Chemistry* 1994, 269: 4705-4708.
141. Yamagishi S., Yamada M., Koshimizu H, Takai1 S, Hatanaka H, Takeda T, Ichijo H, Shimoke K, Ikeuchi T. **Apoptosis-Signal Regulating Kinase-1 Is Involved in the Low Potassium–Induced Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun in Cultured Cerebellar Granule Neurons.** *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 133 : 719–724.
142. Yan J., Roy S., Apolloni A., Lane A., Hancock J. F., **Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase.** *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 24052-24056.
143. Yang, J., Liu,X., Bhall, C. N., Ibrado, A. M., Cai. J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X., **Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked;** *Science* 1997. 275: 1129
144. Yun H.Y., Gonzalez-Zulueta M., Dawson V. and Dawson T. **Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21<sup>Ras</sup>** *Neurobiology* 1998; 95: 5773-5778.
145. Zeng O., Si X., Horstmann H., Xu Y., Hong W., Pallen CJ. **Prenylation-dependent Association of Protein-tyrosine Phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the Plasma Membrane and the Early Endosome.** *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(28): 21444-21452.
146. Zhang F. L. & Casey P.J. **Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences.** *Annual Review of Biochemistry* 1996, 65, 241-269;
147. Zhang J, Wang S, Wesley R.A., Danner R.L. **Adjacent Sequence Controls the Response Polarity of Nitric Oxide-sensitive Sp Factor Binding Sites** *Journal of Biological Chemistry*., 2003, 278: 29192-29200.
148. Zippel R., Balestrini M., Lomazzi M., Sturani E. **Calcium and calmodulin are essential for Ras-GRF1-mediated of the Ras pathway by lypophosphatic acid.** *Experimental Cell Research* 2000; 258: 403-408.