

юридическое лицо публичного права  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ

*На правах рукописи*

**Нана Нармания**

**ВЛИЯНИЕ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ  
Ras ПРОТООНКОБЕЛКА НА ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ НЕРВНЫХ  
КЛЕТОК**

03.00.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации, представленной на соискание научной степени кандидата биологических наук

Тбилиси  
2006

Работа выполнена в Институте Физиологии им. И. Бериташвили

Научный руководитель: **Д. Микеладзе,**  
доктор биологических наук

Официальные опоненты: **Мзия Симонидзе**  
доктор химических наук,

**Лейла Цакадзе**

доктор биологических наук,

**Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 года, в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета по защите диссертации (В. 03-03-N2) Института Молекулярной Биологии и Биологической Физики.**

Адрес: 0160, Тбилиси, ул. Готуа 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Молекулярной Биологии и Биологической Физики.

Адрес: 0159, Тбилиси, ул. Готуа 12

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
к.б.н.

Н. Джапаридзе

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Актуальность проблемы.** На основе многочисленных клинических и экспериментальных данных установлено, что раковые заболевания человека в большинстве случаев обусловлены функциональными нарушениями работы протоонкогенов. Большая часть этих генов определяет рост и дифференциацию клеток, их размножение и формирование популяций. В результате действия различных химических, физических и вирусных факторов в протоонкогенах может произойти точечная или «жесткая» мутация, превращающая его в онкоген. Белковый продукт такого гена не обеспечивает нормальное функционирование клетки и она переходит в нерегулируемое состояние..

Ras белки относятся к семье протоонкобелков, являющимися важными компонентами внутриклеточных сигнальных путей и контролируют такие процессы, как пролиферация, дифференциация и запрограммированная гибель [Bredel et al. 1999]. Так как Ras белки являются ГТФ-связывающими белками, они рассматриваются как основные переключатели клеточного ответа. Неуправляемость Ras функций, которая имеет место при генных мутациях,

делециях и сверхэкспрессиях, наблюдается в 30 % случаев раковых заболеваний человека, и по-видимости, отвечает за патогенез неопластической трансформации [Paul, Frame].

В литературе имеются сведения о том, что активация Ras белка имеет место при воспалительных заболеваниях нервной системы, и коррекция этого процесса оказывает значительный эффект в терапии нейропатологий. С другой стороны установлено, что протекающие в головном мозгу ишемические явления связаны с изменениями в передаче сигнала Ras-путем, что влечет за собой повреждение нервных клеток [Takai 2001]. На основании последних данных можно сказать, что Ras протоонкобелок занимает центральное место в эффектах нейротоксичных соединений, что осуществляется посредством передачи проапоптотического сигнала путем протеинкиназных каскадов определенного типа. Более того, как оказалось, этот белок представляет собой своеобразный переключатель, регулирующий не только про-, но и антиапоптотические сигнальные пути [Rebollo A. et al 1999]. Показано, что Ras белок участвует во многих нейропротекторных эффектах, что делает изучение его функций еще более значимым для нейронаук. Точное определение роли Ras протоонкобелка во внутриклеточных сигнальных процессах затруднено из-за существования множества посттрансляционных модификаций, значение которых до конца не изучено. С этой точки зрения значение принимает определение точных механизмов, регулирующих двойную (про и антиапоптотическую) природу Ras белка, что в последующем даст возможность осуществить целенаправленную коррекцию некоторых патологических процессов на молекулярном уровне.

Двойное действие Ras белка определяется его направлением и действием на нисходящие регуляторные системы. Путем активации Raf/MEK/ERK сигнального пути Ras белок индуцирует апоптоз, а PI3/Akt путем - увеличивает жизнеспособность клетки. Эффект Ras белка выражается в выборочной активации факторов транскрипции, которые вызывают экспрессию про и антиапоптотических генов.

Активность Ras белка, как уже было отмечено, регулируется различными посттрансляционными модификациями, среди которых особое место занимают фарнезилирование и нитрозилирование белковой молекулы. Значение этих модификаций в определении направления действия Ras белка пока не установлено.

Таким образом, Ras белковый каскад представляет собой внутриклеточную регуляторную систему, которая отвечает на множественные раздражения, и на которой пересекаются для клетки жизненно важные про- и антиапоптотические пути [Frame et al. 2001]. Изучение молекулярных основ функционирования Ras белка, определение его роли в патологических процессах является одной из актуальных проблем современной биомедицины.

**Цель и задачи исследования.** Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования являлось изучение роли двух посттрансляционных модификаций Ras протоонкобелка – нитрозилирования и фарнезилирования на ГТФ-азную активность этого белка и его специфичность по отношению к нисходящим эффекторам на протеинкиназном и транскрипционном уровнях.

Для выполнения вышеуказанной цели перед нами были поставлены следующие задачи:

- выделение и очистка цитоплазматического (немодифицированного) и мембранного (фарнезилированного) Ras протоонкобелка из коры и гиппокампа головного мозга крупного рогатого скота.
- изучение изменения ГТФ-азной активности полученного очищенного цитоплазматического препарата под влиянием нитрозилирования и фарнезилирования.
- изучение изменения ГТФ-азной активности полученного очищенного мембранного препарата под влиянием нитрозилирования.

- определение влияния посттрансляционных модификаций Ras протоонкобелка на уровень фосфорилирования протеинкиназ, и соответственно на активацию протеинкиназных каскадов.
- Изучение влияния фарнезилирования и нитрозилирования Ras протоонкобелка на ДНК-связывающую активность некоторых факторов транскрипции.
- определение возможных специфичных нисходящих регуляторов для немодифицированного, нитрозилированного, фарнезилированного и двойного модифицированного Ras протоонкобелка.

**Научная новизна работы.** Изучена ГТФ-азная активность как цитоплазматического, так и мембранного Ras протоонкобелка. Впервые исследовано влияние модификаций на ГТФ-азную активность белка и обнаружен противоположный эффект нитрозилирования мембранного и цитоплазматического Ras белка, что еще раз подтверждает значение модифицирования 186-ого цистеина в белковой молекуле. Обнаружено стимулирующие влияние фарнезилирования на биологическую активность Ras протоонкобелка. Впервые показано влияние посттрансляционных модификаций (фарнезилирования и нитрозилирования) на специфичность нисходящих эффекторов (протеинкиназ, факторов транскрипции) на примере нервных клеток. Изучены изменения ДНК-связывающей активности 8 важнейших факторов транскрипции под влиянием вышеупомянутых модификаций.

**Практическая ценность работы.** Результаты проведенного исследования представляют определенный интерес как для фундаментальной, так и для клинической медицины. В частности, для неврологии и онкологии. Изучение точных механизмов и эффекта влияния посттрансляционных модификаций Ras протоонкобелка даст нам в последующем возможность разработать такие фармакологические препараты, которые смогут переключить проапоптотические процессы на антиапоптотические и, наоборот. Необходимо отметить, что уже началось использование ингибиторов фарнезилирования в онкологии для приостановления процессов трансформации, и полученные нами результаты могут быть использованы для правильной клинической интервенции этих соединений. Определение роли посттрансляционных модификаций особенно важно и для терапии нейродегенерационных заболеваний. В этом случае могут быть использованы такие фармакологические средства, которые подействуют на Ras протоонкобелок и переключат клеточный сигнал на антиапоптотический путь.

Таким образом, модификация Ras протоонкобелка и определение ее точных молекулярных механизмов необходимо для выявления специфичности его нисходящих эффекторов и в последующем для терапии и коррекции клинической картины многих заболеваний.

**Апробация материалов диссертации.** Изложенные в диссертации материалы были представлены на обсуждение на:

- XII Симпозиуме по Клеточной Биологии и Биологии Развития (2004г., Печ, Венгрия).
- IV Форуме Нейронауки Европы (2004г., Лиссабон, Португалия)
- 35-ом Ежегодном Съезде Американского Нейрохимического Общества (2004, Нью-Йорк, США)
- V Форуме Нейронауки Европы (2006г., Вена, Австрия)
- 6-ом Съезде Азия-Тихоокеанского Нейрохимического Общества (2006г., Сингапур)
- 37-ом Ежегодном Съезде Американского Нейрохимического Общества (2004, Портланд, США)

- 31-ом Конгрессе Европейского Биохимического Общества (2006г., Стамбул, Турция)
- Объединенном заседании лабораторий нейрохимии и биохимической нейрофармакологии Института Физиологии им.И.Бериташвили (25 мая, 2006г.)

**Публикации.** На тему диссертации опубликовано 3 статьи и 7 тезисов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 101 страницах компьютерной печати и содержит вступление, обзор литературы, описание материала и методики исследования, обсуждение полученных результатов, выводы и библиографию (148 источника). Диссертация иллюстрирована 18 рисунками и одной схемой. Работа выполнена на грузинском языке.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Хроматографическая очистка цитоплазматического Ras белка из коры крупного рогатого скота.** В процессе хроматографической очистки было использовано 7 буферов: буффер А - 25 mM Tris/HCl pH7.5, который содержал 1mM DTT, 1mM EDTA, 1mM хлорида магния, 0.5mM PMSF (фенилметансульфонилфторид), 5 единиц/мл апротинина и 5 мг/мл леупептина; буффер В - 20 mM Tris/HCl pH7.5, который содержал 1mM DTT, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 5 единиц/мл апротинина и 5 мг/мл леупептина; буффер С - 20 mM Tris/HCl pH7.5, который содержал 1mM DTT, 1mM EDTA, 5mM хлорида магния, 10mM дигидрофосфата калия, 5 единиц/мл апротинина и 5 мг/мл леупептина; буффер D – 0.1M дигидрофосфата натрия pH7.4; буффер E - 0.1M глицин/HCl pH2.8; буффер F - 1M дигидрофосфата натрия pH8.0; буффер G - 10mM дигидрофосфата калия pH7.4, который содержал 1mM DTT и 1mM EDTA.

Каждый этап очистки проводился при температуре 0-4<sup>0</sup> С. Ткань головного мозга крупного рогатого скота гомогенизировалась в равном объеме буфера А. В результате трех последовательных центрифугирований на 2000g, 10000g и 100000g соответственно, были получены цитозольные фракции. Конечный супернатант наносился на DEAE-Servacell смолу, уравновешенную в буфере В. Элюция проводилась ступенчатым градиентом хлорида натрия в буфере В концентрацией 100mM, 200mM, 300mM и 2M. В полученных фракциях измерялась ГТФ-азная активность. Для последующей очистки использовалась самая активная фракция, полученная на 300mM хлорида натрия. После диализа против буфера С белковая фракция наносилась на колонку Sephadex G-75 (4.5x60cm). Элюция производилась буфером С при скорости 30мл/ч. Каждая фракция составляла объемом 5мл, и которых измерялась ГТФ-азная активность. Фракции второго пика наносились на Sepharose колонку, связанную с анти-Ras-антителами (1x7cm), уравновешенную в буфере D. Элюция производилась буфером E со скоростью 15 мл/ч. Нейтрализация pH в собранных фракциях достигалась путем добавления в пробирки буфера F. Фракции, полученные на основном пике в результате хроматографии на анти-Ras-Sepharose колонке подвергались диализу против деионизированной воды в течение ночи и затем наносились на MonoQ HR5/5 колонку, уравновешенную в буфере G. Элюция производилась 40 мл хлорида натрия концентрационным градиентом(от 0 до 0.3M) со скоростью 50 мл/ч. Полученные фракции составляли 1мл объемом каждая, в котором измерялась ГТФ-азная активность. Активные фракции, собранные на 3-ем, главном пике лиофилизировались и подвергались дальнейшему изучению.

**Хроматографическая очистка мембрана-связанного Ras белка из коры крупного**

**рогатого скота.** Кора головного мозга крупного рогатого скота гомогенизировалась в равном объеме буфера А и центрифугировалась на 2000g и 10000g, в результате чего получали синаптические мембраны. Конечный осадок, полученный после второго центрифугирования, солюбилизировался в 4.5%-ом растворе деоксихолата натрия в буфере В, в течение одного часа. Мембранные белковые фракции были получены путем центрифугирования суспензии на 100000g в течение одного часа. Полученный супернатант наносился на Sephadex G-75 колонку, уравновешенную в буфере С, содержащем 0.5% деоксихолата натрия. Элюция с колонки производилась буфером С при скорости 30мл/ч. Каждая фракция составляла объемом 5мл, и которых измерялась ГТФ-азная активность. Активные фракции второго пика наносились на анти-Ras-Sepharose колонку (1x7см), уравновешенную в буфере D. Элюция производилась буфером Е со скоростью 15 мл/ч. Нейтрализация рН в собранных фракциях достигалась путем добавления в пробирки буфера F. Фракции, полученные на основном пике в результате хроматографии на анти-Ras- Sepharose колонке подвергались диализу против деионизированной воды в течение ночи и затем наносились на MonoQ HR5/5 колонку, уравновешенную в буфере G, содержащем 0.68% CHAPS. Элюция производилась 40мл-ми хлорида натрия концентрационным градиентом (от 0 до 0.3M) со скоростью 50 мл/ч. Полученные фракции составляли 1мл объемом каждая, в котором измерялась ГТФ-азная активность. Активные фракции, собранные на 3-ем, главном пике лиофилизировались и подвергались дальнейшему изучению.

**Анализ полученных белковых фракций** проводился на плоском полиакриламидном геле, на аппарате “Phast System” (Pharmacia, Швеция).

**Определение ГТФ-азной активности белка.** 10мкл раствора белка (70мкг) преинкубировались с  $[8-^{14}\text{C}]\text{-GTP}$  (660000 cpm – 3nM) в течение 30 минут при комнатной температуре в 40мкл общего объема 50mM HEPES буфера рН7.6, содержащего 0.2мг/мл альбумина сыворотки крупного рогатого скота и 1mM EDTA.

Инициация ГТФ-азной реакции производилась путем добавления 5mM хлорида магния. Из пробирки извлекался образец 10мкл и образование  $[8-^{14}\text{C}]\text{-GTP}$  измерялось с помощью тонкослойной хроматографией на PEI (полиэтиленимин) целлюлозных пластинках. Разделение нуклеотидов происходило в 0.75M калий-фосфатном буфере рН3.5. Количество GDP определялось сцинтиляторным счетчиком и экспериментальная погрешность составляла от 10 до 20%.

**Фарнезилирование очищенного Ras белка.** Фарнезилирование очищенного Ras белка производилось по методике Berezovsky et al. 2002. Реакционная среда содержала раствор Ras белка (30мг/мл), фарнезилтрансферазу (конечная концентрация 100nM), фарнезилпирофосфат (50nM), 10mM хлорида магния, 5mM DTT, 50mM HEPES рН7.5. Иницирование реакции происходило путем добавления Ras белка. Для сравнения производился контрольный эксперимент, где вместо Ras белка добавлялся ферментативный буфер. Для измерения ГТФ-азной активности из реакционной среды с интервалом 0, 20, 40 и 60 минут извлекалось по 10 мкл, которые наносились на PEI пластинки.

**Нитрозилирование очищенного Ras белка.** Нитрозилирование очищенного Ras белка *in vitro* производилось по методике Williams et al. 2003. Реакционная среда содержала раствор Ras белка (30мг/мл), S-нитрозоцистеин (100nM), 10mM хлорида магния, 5mM DTT, 50mM HEPES рН7.5. В параллельных экспериментах в среду добавлялись фермент фарнезилтрансфераза (100nM) и фарнезилпирофосфат (50nM). Иницирование реакции происходило путем добавления Ras белка. Для сравнения производился контрольный эксперимент, где вместо Ras белка добавлялся ферментативный буфер. Для измерения ГТФ-азной активности из реакционной среды с интервалом 0, 20, 40 и 60 минут извлекалось по 10 мкл, которые наносились на PEI пластинки.

**Получение первичной смешанной культуры.** Первичная глия/нейронная культура была получена из головного мозга новорожденных лабораторных крысят. Диссоциация клеток производилась в питательной среде DMEM, содержащей 10% телячьей сыворотки (FBS)

и 2mM L-глутамин, в результате действия 0.027% раствора трипсина в течение 30 минут [Miyamoto et al. 1989].

**Выращивание клеточной культуры** производилось в специальном инкубаторе при температуре 37<sup>0</sup> С в условиях 5% CO<sub>2</sub>. Инкубация с активными соединениями (L-NAME конечной концентрацией 1mM, манумицин конечной концентрацией 10μM) происходила в течение 24 часов, после чего из клеточной суспензии получали цитоплазматический и ядерный экстракты.

**Получение цитоплазматического и ядерного экстрактов.** [BD Mercury Protocol] После 24-часовой инкубации с активными соединениями клеточная суспензия центрифугировалась в течение 5 минут на 450g. К полученному осадку добавлялся лизисный буфер в двукратном объеме (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1mM DTT, леупептин, апротинин в 10mM HEPES pH7.9). Разрушение клеток производилось иглой №27 10 раз. Полученный гомогенат центрифугировался в течение 20 минут на 10000g. Полученный супернатант сохранялся в отдельных пробирках при температуре 4<sup>0</sup>С как цитозольная фракция. К оставшемуся осадку добавлялся буфер ядерной экстракции в равном объеме (1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.42 NaCl, 0.2mM EDTA, 1mM DTT, леупептин, апротинин в 20mM HEPES pH7.9). Разрушение ядер производилось вышеописанным способом с использованием новой иглы. Полученный гомогенат отстаивался в течение 30 минут при температуре 4<sup>0</sup>С при постоянном встряхивании. После этого гомогенат центрифугировался в течение 20 минут на 20000g. Полученный супернатант переносился в чистые пробирки и сохранялся при температуре -70<sup>0</sup>С как ядерный экстракт

**Иммуноблоттинг регуляторных белков.** Определение уровня различных белковых продуктов (в нашем случае p-ERK, p-Akt, p-JNK) в цитоплазматических экстрактах проводилось методом Western blotting на нитроцеллюлозной мембране Hybond ECL [Samdani et al. 1997]. Детекция мембраны производилась путем хемилюминисценции с использованием набора ECL (Amersham, США)

**Определение уровня факторов транскрипции** производилось в ядерных экстрактах с использованием BD Mercury TM TransFactor набора, согласно описанию фирмы-производителя [BD Mercury Protocol].

**Статистическая обработка** полученных в ходе эксперимента результатов производилась ANOVA методом. Анализ данных каждого эксперимента производился отдельно, при высокой степени достоверности сравнение проводилось с использованием t-теста.

## ПОЛУЧЕННЫЕ ДАННЫЕ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Влияние модификаций (фарнезилирования и нитрозилирования) Ras белка на его ГТФ-азную активность

Ras белки играют важную роль в протекании биологических процессов, изменяют морфологию клетки и экспрессию генов, участвующих в увеличении жизнеспособности клеток и апоптозе [Olson and Marias, 2000]. Биологическая активность Ras белка частично регулируются его посттрансляционными модификациями, среди которых следует отметить фарнезилирование (включение изопреновой группы и последующее встраивание в мембрану) и нитрозилирование (связывание нитрозо групп с цистеиновыми остатками белковой молекулы). На сегодняшний день действие вышеупомянутых модификаций Ras белка на его ГТФ-азную активность и биологическое функционирование до конца не изучено. Фарнезилирование Ras белка необходимо для его транслокации в мембрану. Этот процесс проходит при участии фермента фарнезилтрансфераза, который катализирует перенос фарнезильной группы, связанной тиоэфирной связью, с фарнезилпирофосфата на С-

терминальный цистеиновый остаток белка. Вместе с другими С-терминальными модификациями, изопреновый остаток определяет внутриклеточную локализацию белка и его ассоциацию со специфичными мембранными белками [Pennisi et al, 1997].

Молекула Ras протоонкобелка содержит цистеиновые остатки, которые в соответствующих условиях могут нитрозилироваться оксидом азота [Lader 1996]. Ведущую роль среди цистеиновых остатков играет 118-ый цистеиновый остаток, который находится около NKXD гуанидиннуклеотид-связывающей последовательности, а также локализованные в С-терминальном регионе белка Cys-181, Cys-184 и Cys-186 остатки. Cys-181, Cys-184 и Cys-186 остатки являются целью для модификаций и потенциальным регулирующим сайтом для нитрозилирования [Williams et al., 2003]. Таким образом, тип модификации 186-ой цистеина молекулы Ras белка (будет это нитрозилирование или фарнезилирование) возможно играет важную роль в регуляции биологической активности этого белка. Исходя из вышесказанного, особое значение приобретает изучение влияния нитрозилирования и фарнезилирования на ГТФ-азную активность Ras протоонкобелка.

Для исследования действия нитрозилирования и фарнезилирования Ras белка на его ГТФ-азную активность производилась очистка Ras белка и получение его чистого препарата. С использованием нескольких хроматографических ступеней из головного мозга крупного рогатого скота был очищен цитоплазматический и мембрана-связанный Ras белок. Ткань коры головного мозга крупного рогатого скота гомогенизировалась, и полученные в результате ступенчатого центрифугирования цитозольные и мембранные фракции наносились на DEAE-Servacell гель, элюция которых производилась ступенчатым градиентом хлорида натрия последовательно (100mM, 200mM, 300mM и 2M NaCl). В полученных фракциях измерялась ГТФ-азная активность и в последующей очистке использовалась фракция, полученная при концентрации 300mM. Эта фракция наносилась на Sephadex G-75 колонку. Активные фракции, полученные во втором белковом пике (рис. 1) наносились на колонку с анти-Ras-Sepharose. Фракция, полученная в основном пике наносились на Mono Q HR5/5 колонку, после чего производилась лиофилизация и электрофорезное изучение активных фракций (рис. 2).

Для определения чистоты полученных очищенных (цитоплазматических и мембранных) препаратов проводился SDS-электрофорезный анализ на полиакриламидном геле, для окраски геля использовался нитрат серебра (рис. 3). ГТФ-азная активность белков определялась во времени и измерялась в течение одночасовой инкубации. ГТФ-азная активность цитоплазматического Ras белка составляла  $6.5 \pm 0.4$  пмоль/мг/мин, в то время как активность связанного с мембраной белка составляла  $18.7 \pm 0.9$  пмоль/мг/мин в условиях наших экспериментов.

Для изучения эффекта нитрозилирования и фарнезилирования на очищенный Ras белок очищенный препарат инкубировался с S-нитрозоцистеином для нитрозилирования, и с фарнезилтрансферазой и фарнезилпирофосфатом с целью фарнезилирования. Установлено, что в условиях S-нитрозоцистеина ГТФ-азная активность цитоплазматического Ras белка заметно увеличивается, в то время как фарнезилирование вызывает значительное ингибирование ГТФ-азной активности (рис. 4). Добавление фарнезилтрансферазы и фарнезилпирофосфата в инкубационную среду снижало ГТФ-азную активность цитоплазматического Ras белка до 83% по сравнению с контрольным препаратом. При одинаковых условиях ГТФ-азная активность фарнезилированного Ras белка составляла  $5.4 \pm 0.4$  пмоль/мг/мин, в то время как ГТФ-азная активность нитрозилированного Ras белка была значительно увеличена по сравнению с контрольным препаратом и равнялась  $9.8 \pm 0.6$  пмоль/мг/мин. Таким образом, нитрозилирование и фарнезилирование оказывает противоположный эффект на ГТФ-азную активность цитоплазматического белка.

Что касается связанного с мембраной (и соответственно уже фарнезилированного) Ras белка, была изучена его ГТФ-азная активность после инкубации с S-нитрозоцистеином (рис. 5). ГТФ-азная активность нитрозилированного мембрана-связанного Ras белка была снижена

до 73% по сравнению с контрольным препаратом и равнялась  $13.6 \pm 0.6$  пмоль/мг/мин. Эти данные подтверждают предположение о том, что в цитоплазматическом и связанном с мембраной Ras белках нитрозилируются различные цистеиновые остатки и такие многосторонние модификации возможно регулируют его ГТФ-азную активность.

Полученные нами результаты показали, что нитрозилирование цитоплазматического (дефарнезилированного) Ras белка вызывает значительную стимуляцию его ГТФ-азной активности. Также установлено, что ГТФ-азная активность Ras белка ингибируется фарнезилированием, и уровень активности частично восстанавливается в присутствии донора NO (Cys-NO). Полученные результаты подтверждают предположение о том, что нитрозилирование реагентом – донором NO С-терминальных цистеиновых остатков, в частности Cys-186, изменяет изопренилирование белка. Если принять во внимание то, что Ras белок постоянно активируется после связывания ГТФ и инактивируется в результате гидролиза до ГДФ, можно предположить, что лимитирующей ступенью в этом процессе является реакция замещения молекулы ГДФ на ГТФ. Согласно полученным нами данным, увеличение ГТФ-азной активности Ras белка в условиях его нитрозилирования возможно удлиняет период неактивного состояния белка. Кроме того, необходимо отметить, что в данном случае (нитрозилирования) становится невозможным протеолитическое удаление ААХ – последовательности из молекулы очищенного Ras-белка и карбоксиметилирование его С-конца. Таким образом, можно заключить, что только фарнезилирование достаточно для ингибирования ГТФ-азной активности Ras белка и соответственно для сохранения его в активном, ГТФ-связанном состоянии. Этим можно объяснить тот факт, что некоторые ингибиторы фарнезилтрансферазной реакции вызывают регрессию Ras-зависимых злокачественных опухолей и эффективны в лечении различных гематологических опухолевых заболеваний [Mazieres, 2004]. Способность доноров NO прямо и эффективно снижать процесс фарнезилирования может использоваться в терапии многих тяжелых заболеваний, что в последующем обеспечит стратегию использования доноров оксида азота в лечении различных опухолей.

Связанный с мембраной Ras белок в результате протеолитической реакции теряет свою СААХ последовательность, соответственно Cys-186, а также в случае H-Ras, N-Ras и K-Ras4A один (N-Ras) или два (H-Ras и K-Ras4A) следующих сразу за СААХ последовательностью цистеиновых остатка подвергаются палмитированию. Таким образом, из вышесказанного можно сделать вывод, что в условиях присутствия оксида азота может модифицироваться только Cys-118. Некоторые авторы указывают на то, что Ras белок действительно модифицируется в 118-ом цистеиновом остатке, и этот процесс усиливает обмен гуанидиновых нуклеотидов и участвует в положительной регуляции передачи сигнала [Mott 1997, Williams 2003]. Полученные нами результаты совпадают с вышеизложенными данными, так как в ходе наших экспериментов установлено, что доноры оксида азота вызывают ингибирование ГТФ-азной активности и тем самым удлиняют период активного (ГТФ-связанного) состояния Ras белка.

Как уже было отмечено, точечные мутации *ras* гена, главным образом доминант-онкогенные, найдены в большом количестве в опухолях человека. Самые активные мутации поражают ГТФ-азную активность белка, оставляя Ras белок в активном состоянии, в результате чего усиливается стимуляция роста клетки. Определение Ras-мутаций при раковых заболеваниях даст возможность лучше разобраться в биологии и патогенезе рака, что имеет клиническое значение для ранней диагностики и прогнозирования заболевания, а также для разработки новых терапевтических средств [Heppner, 2002].

Таким образом, можно предположить, что цитоплазматический, также как и мембрана-связанный Ras белок может модифицироваться нитрозилированием. Нитрозилирование цитоплазматического белка может произойти на С-терминальном 186-ом цистеиновом остатке, что в последующем обуславливает превенцию фарнезилирование, протеолитическое отщепление ААХ последовательности и карбоксиметилирование оставшегося С-конца, а

также уменьшение ГТФ-связанного активного периода Ras белка. Противоположное можно сказать о мембрана-связанном Ras белке, который нитрозилируется на 118-ом цистеином остатке и полученная модификация снижает ГТФ-азную активность и соответственно увеличивает длительность активного (ГТФ-связанного) состояния Ras белка.

## **2. Ингибирование синтазы оксида азота и фарнезилтрансферазы изменяет активность некоторых факторов транскрипции.**

Ras белок и его сигнальный каскад является одной из главных регуляционных систем, так как его активация связана с фундаментальными изменениями клетки. Ras белок, мутация гена которого обуславливает онкогенную трансформацию, вызывает с одной стороны апоптоз клетки, а с другой стороны увеличение жизнеспособности. Такая двойная природа Ras белка определяется направлением его действия на его нисходящие регуляционные системы [Crespo et al. 2000]. В результате активации Raf/MEK/ERK пути Ras вызывает апоптоз, а PI3/Akt сигнальным путем увеличивает жизнеспособность клетки. Эффект Ras-белка выражается в избирательной активации факторов транскрипции, которые контролируют экспрессию про- и антиапоптотических генов. Необходимо отметить, что механизм, определяющий нисходящую специфику Ras эффекта, до сих пор не известен.

Исходя из вышеизложенного, нами была изучена активность некоторых нисходящих эффекторов Ras белка. Для характеристики Ras-зависимых нисходящих путей и для определения влияния на них посттрансляционных модификаций были использованы ингибитор фарнезилтрансферазы – манумицин и ингибитор синтазы оксида азота – L-NAME. Как известно, ингибирующий эффект манумицина на фарнезилтрансферазу обусловлен его конкуренцией с ее субстратом – фарнезилпирофосфатом и широко используется для охарактеризования Ras-сигнального пути.

Первоначально было изучено влияние ингибиторов на жизнеспособность нервных клеток и уровень активации трех основных протеинкиназных каскадов (Akt, ERK и JNK). В ходе экспериментов оказалось, что ни манумицин, ни L-NAME не оказывают значительного апоптотического эффекта на клетки. Оказалось, что в результате одновременного или отдельного добавления манумицина и L-NAME уменьшается уровень фосфорилирования Akt протеинкиназы, что указывает на то, что конституционный уровень NO в клетке, а также физиологическая активность фарнезилтрансферазы необходимы для включения PI3/Akt протеинкиназного пути (рис. 6).

В дальнейшем оказалось, что манумицин, также как и L-NAME увеличивает уровень фосфорилирования ERK-киназы. По-видимому, это является результатом нарушения метаболизма клетки, который имеет место при изменениях конституционного уровня NO и постоянного фарнезилирования и возможно носит компенсационный характер. При одновременном добавлении L-NAME и манумицина уровень фосфорилирования ERK возвращается к нормальным показателям, полученным в контрольных образцах (рис. 6). Вышеизложенные результаты указывают на то, что одновременное ингибирование фарнезилирования и снижение концентрации оксида азота не изменяет степень активации ERK-каскада.

В следующих экспериментах обнаружилось, что манумицин не изменяет уровень фосфорилирования JNK, однако концентрация фосфорилированных форм этого белка увеличивается в присутствии L-NAME. Этот факт можно объяснить тем, что конституционный уровень NO обуславливает супрессию JNK-киназы (рис. 6), а ее активация носит компенсационный характер и не требует фарнезилирования Ras-белка. На основании представленных данных можно предположить, что на определенных уровнях регуляционных путей нитрозилирование пересекается с фарнезилированием, в результате чего изменяется

активность промежуточных протеинкиназ. В данном случае этой точкой пересечения является Ras протоонкобелок.

Известно, что Raf/MERK/ERK и PI3-киназа /Akt сигнальные пути действуют на активность некоторых факторов транскрипции, в том числе c-Fos, c-Jun, NF-κB, STAT, ATF-2, CREB и Sp1 [Garrington, 1999] и таким образом проявляют свой эффект на экспрессию генов.

Исходя из вышесказанного, в следующей серии экспериментов определялась ДНК-связывающая активность данных факторов транскрипции в присутствии L-NAME и манумидина. Установлено, в результате одновременного и отдельного действия манумидина и L-NAME увеличивается активность c-Fos фактора (рис. 7). Данный факт указывает на то, что фарнезилирование и нитрозилирование Ras белка снижают транскрипционную активность c-Fos-a.

Также обнаружилось, что добавление L-NAME в клеточную культуру вызывает снижение ДНК-связывающей активности STAT фактора (рис. 8), что говорит о том, что конституционный уровень NO необходим для действия STAT. Добавление только манумидина не оказывает никакого эффекта, в то время как присутствие данного соединения снимает вызванное добавлением L-NAME ингибирование ДНК-связывающей активности STAT-фактора. В последующих экспериментах обнаружилось, что добавление L-NAME в питательную среду культуры незначительно снижает ДНК-связывающую активность Sp1 фактора транскрипции, а в присутствии манумидина транскрипционную активность возвращается к контрольным показателям (рис. 9).

Интересен также тот факт, что L-NAME подобно манумидину снижает ДНК-связывающую способность NF-κB фактора, что указывает на необходимость конституционного уровня оксида азота и фарнезилированного Ras белка для транскрипционной активности NF-κB (рис. 10).

В ходе дальнейших исследований оказалось, что манумидин и L-NAME оказывают подавляющее действие на ДНК-связывающую активность c-Jun фактора, и что одновременное добавление этих соединений не изменяет транскрипционную активность вышеупомянутого фактора (рис. 11). С другой стороны оказалось, что L-NAME увеличивает ДНК-связывающую активность ATF-2-фактора транскрипции, однако манумидин снимает вызванный добавлением L-NAME активирующий эффект. Таким образом можно заключить, что активацию ATF-2 фактора обуславливает денитрозилированный и фарнезилированный Ras-белок. Также оказалось, что манумидин повышает ДНК-связывающую активность JunD фактора, однако L-NAME элиминирует этот эффект. Полученные данные указывают на то, что вышеупомянутый фактор проявляет наивысшую активность в нитрозилированном и дефарнезилированном состоянии. Что касается CREB транскрипционного фактора, уровень его активности не испытывает статистически достоверных изменений.

Проведенные нами исследования показали, что ДНК-связывающая активность некоторых факторов транскрипции зависит от внутриклеточного уровня оксида азота и от процесса фарнезилирования. Полученные результаты выявили положительную корреляцию между фосфорилированием ERK и JNK и ДНК-связывающей активностью ATF-2 и JunD факторов транскрипции, а также негативную корреляцию между фосфорилированием JNK и ДНК-связывающей активностью STAT фактора. Однако никакой видимой корреляции между уровнем фосфорилирования Akt и активностью определенных транскрипционных факторов найдено не было.

Согласно полученным нами данным постоянный уровень оксида азота в клетке и ингибирование фарнезилирования изменяет ДНК-связывающую активность некоторых факторов транскрипции. Установлено, что вызванное манумидином ингибирование фарнезилирования снижает способность NF-κB связываться с ДНК, не изменяет активность STAT, ATF-2, CREB, Sp1 факторов и увеличивает ДНК-связывающую активность c-Fos,

JunD, c-Jun факторов транскрипции. При данных условиях уровень фосфорилирования Akt киназы заметно снижен, фосфорилирование ERK увеличено, а степень активации JNK не изменен. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что PI3/Akt киназа является основным путем, который различными механизмами переключает сигнал с антиапоптотического на проапоптотический и, наоборот, а также представляет собой одну из основных мишеней для ингибиторов фарнезилирования [Jiang 2000]. Akt обуславливает негативную регуляцию апоптоза посредством сигнал-регулирующей киназы-1 (ASK1), что обеспечивает превенцию активации p38 и c-Jun в культуре нейронов головного мозга [Yamagishi 2003]. Таким образом, ингибирование фарнезилирования Ras белка и соответственно снижение активности Akt протеинкиназы может вызвать активацию c-Jun фактора транскрипции. С другой стороны, усиление ДНК-связывающей способности c-Fos и JunD факторов, вызванное добавлением манумидина коррелирует с фосфорилированием ERK киназы, что указывает на то, что данная протеинкиназа участвует в активации c-Fos и JunD. JunD, c-Jun и c-Fos белки обычно являются компонентами AP1 комплекса, содержащего JunD и c-Fos, активность которых увеличивается в результате ингибирования протеинкиназы 2 [Cassese et al. 1998]. Кроме того, активация AP1, содержащего JunD и c-Fos, под действием манумидина отражает ингибирование дефосфорилирования ERK киназы. Помимо Ras белка мишенью манумидина в данном случае может являться семья PRL-фосфатаз, которые в результате фарнезилирования изменяют свою локализацию в ядре [Zeng 2000]. Интересно, что активность другого члена AP1 - ATF-2 фактора, являющего субстратом JNK, не изменяется в результате обработки клеток манумидином. Балланс между ATF2 и c-Jun в AP1 комплексе является значимым фактором для решения того, каким путем пойдет клетка – путем нейронного дифференцирования или альтернативным путем гибели, и зависит от активности JNK киназы [Lerra 2000]. Так как в вышепредставленных экспериментах не обнаружилось манумидин-зависимого изменения активности JNK, на основании полученных данных можно установить, что содержание ATF-2 фактора в AP1 комплексе также не изменяется.

Также установлено, что в результате действия манумидина снижается ДНК-связывающая активность NF-κB, что указывает на значение фарнезилирования, и соответственно, на необходимость метилирования и транслокации Ras белка в мембрану для биологического функционирования NF-κB фактора. Снижение ДНК-связывающей активности NF-κB коррелирует со снижением уровня фосфорилирования Akt протеинкиназы и не коррелирует с процессами фосфорилирования JNK и ERK. Ингибитор NF-κB - белок IκB может фосфорилироваться (и тем самым расщепляться) под действием ERK и Akt протеинкиназ [Celes 2004], однако в нейронах для полной активации NF-κB необходим Ras/PI3/Akt путь [Lilienbaum, 2000]. Полученные нами данные полностью совпадают с вышеизложенными литературными данными.

NO возможно также принимает участие в редокс-контроле транскрипции путем регуляции ДНК-связывающей активности таких факторов транскрипции, как NF-κB [Matthews 1996], AP1 [Tabuchi 1994] и Sp1 [Zhang 2003]. Согласно полученным нами данным, вызванное добавлением L-NAME снижение внутриклеточной концентрации NO увеличивает активность c-Fos, ATF-2 и JunD факторов и уменьшает ДНК-связывающую активность STAT, Sp1 и c-Jun. Активность этих транскрипционных факторов восстанавливается до нормального уровня в присутствии манумидина, что указывает на то, что одновременное фарнезилирование и нитрозилирование изменяет направление контролируемых Ras белком нисходящих путей. Более того, в присутствии L-NAME отмечается увеличение ДНК-связывающей активности c-Fos и JunD факторов вместе с усилением фосфорилирования ERK протеинкиназы. В условиях клеточного уровня L-аргинина NO ингибирует активность ERK киназы Ras-зависимым механизмом [Raines 2004]. Согласно проведенным нами

экспериментам уровень фосфорилирования ERK в присутствии L-NAME увеличивается, что подтверждает тот факт, что нитрозилирование Ras белка ингибирует фосфорилирование ERK киназы, за чем следует активация AP1 комплекса.

Sp1 и Sp3 являются ДНК-связывающими белками содержащими цинковые пальчики, которые участвуют в экспрессии характерных для клетки специфичных генов, что подразумевает регуляцию транскрипции ряда нейроспецифичных генов подобно субъединиц лиганд-чувствительных ионных каналов [Melnikova 2001, Мао 2002]. Оксидационный стресс значительно увеличивает уровень и ДНК-связывающую активность Sp1 и Sp3 белков, а повышенная экспрессия Sp1 и Sp3 усиливает выживание нейронов коры головного мозга [Ryu 2003]. Обе, Ras-зависимые ERK и PI3-киназа/Akt пути являются решающими для увеличения ДНК-связывающей активности Sp1 и Sp3 факторов транскрипции [Melnikova 2001]. Полученные нами результаты в точности совпадают с вышеизложенными данными, тпоскольку L-NAME снижает ДНК-связывающую активность Sp1 фактора и это уменьшение коррелирует со снижением активности Akt. Вторым транскрипционным фактором, активность которого снижается под действием L-NAME, является STAT-1. Передатчики JAK-сигнала и активаторы транскрипционного сигнала (JAK-STAT) являются основным путем в воспалительных процессах, который ведет к экспрессии некоторых связанных с воспалением генов [Darnell, 1997]. STAT представляет собой латентный цитоплазматический фактор транскрипции, который активируется после его ассоциации с рецепторным комплексом. В центральной нервной системе JAK STAT воспалительный сигнал опосредует стимулируемую ганглиозидами активацию микроглии, которая выражается в фосфорилирование ERK киназы, что указывает на пересечение JAK и ERK сигнальных путей [Kim 2002]. Более того, JAK напрямую включен в стимулированную Ruk2 киназой активацию Ras-МАРК пути и индукцию c-fos и c-myc генов [Miyazaki 1998]. В наших глия-нейронных препаратах манумидин не изменяет ДНК-связывающую активность STAT фактора, однако элиминирует вызванный L-NAME эффект.

Согласно вышеизложенным данным ДНК-связывающая активность некоторых факторов транскрипции изменяется при снижении постоянного уровня оксида азота в клетке и ингибировании фарнезилирования. Полученные нами результаты имеют определенное значение для последующих исследований, в которых до конца определиться роль посттрансляционных модификаций Ras белка на специфичность нисходящих сигнальных каскадов и физиологический ответ клетки.

## ВЫВОДЫ

1. ГТФ-азная активность Ras протоонкобелка регулируется его посттрансляционными модификациями, в частности, фарнезилированием и нитрозилированием.
2. Нитрозилирование цитоплазматического (дефарнезилированного) Ras-белка вызывает значительную стимуляцию ГТФ-азной активности, а фарнезилирование – ее ингибирование.

3. Нитрозилирование мембранного (фарнезилированного) Ras-белка вызывает снижение ГТФ-азной активности, что можно объяснить существованием альтернативного сайта для модификации.
4. Посредством фарнезилирования и нитрозилирования осуществляется прекрестная регуляция нисходящих протеинкиназ; в частности, нитрозилированный и фарнезилированный Ras белок активирует Akt каскад, в то время, как активация ERK имеет место в случае снижения интенсивности фарнезилирования и нитрозилирования. Необходимо отметить, что активность JNK протеинкиназы увеличивается в условиях ингибирования нитрозилирования.
5. Основным эффектором включенного в мембрану, фарнезилированного и нитрозилированного Ras-белка является NF- $\kappa$ B транскрипционный фактор. Основными эффекторами включенного в мембрану, но нитрозилированного Ras-белка являются ATF-2 и JunD транскрипционные факторы.
6. Основной нисходящей мишенью цитоплазматического нитрозилированного Ras-белка является JunD транскрипционный фактор, а основными эффекторами немодифицированного Ras-белка является c-Jun, STAT и Sp1 транскрипционный фактор; из-за короткого периода полураспада цитоплазматического Ras-белка активация этих факторов должна носить транзиторный характер.
7. Высказано предположение, что фарнезилирование и нитрозилирование Ras-белка обуславливает регуляцию его ГТФ-азной активности и изменение специфичности нисходящих эффекторов.

#### Список работ, опубликованных на тему диссертации:

1. Barbakadze T., Zhuravliova E., Narmania N., Sanikidze T., Kekelidze T., Mikeladze D. **Effects of guanidine analogs of creatine on the formation of reactive oxygen species and viability of primary neuronal/glia cells.** *Journal of Biological Physics and Chemistry* 2004; 4: 25-32.
2. Narmania N., Zhuravliova E., Barbakadze T. and Mikeladze D. **Farnesylation and nitrosylation of p21Ras change its intrinsic GTPase activity.** *Journal of Biological Physics and Chemistry* 2005, 5: 137–140.
3. Narmania N., Zhuravliova E., Barbakadze T., Khundadze M., Mikeladze D. **Double modifications of Ras protein change the DNA-binding activities of transcription factors.** *Proceedings of Georgian Academy of Sciences, Biological Series A*, 2006, 32(4): 815-821.
4. Barbakadze T., Juravleva E., Narmania N., Ramsden J. & Mikeladze D. **Simultaneous action of farnesyltransferase and nitric oxide synthase can change the direction of Ras-dependent down-stream pathways.** *4th Forum of European Neuroscience, Lisbon, July 10-*

- 14, 2004. *Abstract Book 191: A081.3.*
5. Barbakadze T., Juravleva E., Narmania N., Ramsden J. & Mikeladze D. **“Farnesyltransferase and nitric oxide synthase inhibitors change the activities of c-jun and other transcription factors.** *Twelfth Symposium on Cell and Developmental Biology, Pecs, April 17, 2004. Abstract Book 26.*
  6. Zhuravliova E., Barbakadze T., Narmania N., Ramsden J., Mikeladze D. **Mamumycin and L-NAME change the direction of Ras-dependent down-stream pathways.** *Journal of Neurochemistry, 2004, vol. 90, s1, p20.*
  7. Zhuravliova E., Barbakadze T., Narmania N. and Mikeladze D.G. **Haloperidol induces neurotoxicity by the NMDA receptor downstream signalling pathway, alternative from glutamate excitotoxicity.** *Journal of Neurochemistry, 2006, 96 (Suppl. 1), 21–62*
  8. Zhuravliova E., Barbakadze T., Narmania N. Sepashvili M. and Mikeladze D.G. **The neuroprotective effect of insulin involves activation of membrane-bound Ras and downstream antiapoptotic pathway through the association of GRF-SOS adaptor protein.** *5th Forum of European Neuroscience, Vienna, July 8-12, 2006. Abstract Book 512: A202.16..*
  9. Narmania N., Barbakadze T., Zhuravliova E. and Mikeladze D.G. **Post-translational modifications change the direction of Ras-dependent downstream pathways.** *31<sup>st</sup> FEBS Congress, FEBS Journal, 2006, 273(s1): 82.*
  10. Barbakadze T., Zhuravliova E., Sepashvili M., Narmania N. and Mikeladze DG. **Farnesylation and nitrosylation change the intrinsic GTP-ase activity of p21<sup>Ras</sup>.** *Journal of Neurochemistry 2006, 98 (s1), 121-126.*