

საჯარო სამართლის იურიდიული პირი
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

ნანა ნარმანია

**Ras-პროტოონკოცილის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენა ნერვული
უჯრედის ტრანსკრიფციულ აქტივობაზე**

03.00.03 – მოლეკულური ბიოლოგია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი
2006

ნაშრომი შესრულებია ივ. ბერიტაშვილის სახელობის
ფიზიოლოგიის ინსტიტუტში

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
დავით მიქელაძე

ოფიციალური ოპონენტები: ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი
მზია სიმონიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
ლეილა წაქაძე

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის _____ საათზე,
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტის სადისერტაციო
საბჭოს სხდომაზე (B. 03-03-N2).

მისამართი: 0160, თბილისი, გოთუას ქ. 12

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური
ფიზიკის ინსტიტუტის ბიბლიოთეკაში.

მისამართი: 0160, თბილისი, გოთუას ქ. 12

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2006 წლის _____

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი,
ბიოლოგიურ მეცნიერებათა კანდიდატი

ნ. ჯაფარიძე

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

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

Ras ცილები მიეკუთვნებიან ე.წ. პროტონკოცილების ოჯახს, რომლებიც წარმოადგენენ მნიშვნელოვან კომპონენტებს უჯრედშიდა სასიგნალო გზებში და აკონტროლებენ ისეთ მნიშვნელოვან პროცესებს, როგორცაა პროლიფერაცია, დიფერენციაცია და უჯრედის პროგრამირებული სიკვდილი [Bredel et al. 1999]. მიეკუთვნებიან რა GTP-დამაკვაშირებელი ცილების ოჯახს, ისინი განიხილებიან როგორც უჯრედული პასუხების მოლეკულური გადამრთველები. Ras-ის ფუნქციის უმართავობა, რომელსაც ადგილი აქვს გენური 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, რომ Ras-ის აქტივაციას ადგილი აქვს აგრეთვე ნერვული სისტემის ანთებითი დაავადებების დროს, და მისი ფუნქციური კორექცია მნიშვნელოვან ეფექტს ავლენს ნეიროპათოლოგიების თერაპიაში. დადგენილია, რომ თავის ტვინში მიმდინარე იშემიური მოვლენები დაკავშირებულია Ras-ის 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 ნეიროტოქსიკური 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 მსვლელობას [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 პოსტტრანსლაციური 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.

Ras-ის ორმაგი ეფექტი განისაზღვრება მისი მოქმედების მიმართულებით და დაღმავალ რეგულაციურ სისტემებზე გავლენით. Raf/MEK/ERK გზის გააქტივებით Ras იწვევს აპოფტოზს, ხოლო PI3/Akt გზით კი იგი უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას

ზრდის. Ras-ის ეფექტი ტრანსკრიპციული ფაქტორების შერჩევით აქტივაციაში აისახება, რომლებიც პრო- ან ანტი-აპოფტოზური გენების ექსპრესიას იწვევენ.

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

ამრიგად, ღას-ის ცილოვანი კასკადი წარმოადგენს უჯრედშიდა რეგულაციურ სისტემას, რომელიც პასუხობს მრავალი ტიპის გაღიზიანებას, და რომელზეც გადაიკვეთება უჯრედისათვის საციცოხლო მნიშვნელობის პრო- და ანტი-აპოფტოზური გზები [Fრამე ეტ ალ. 2001]. ღას-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 ღას-პროტონკოცილის ორი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის – ნიტროზილირების და ფარნეზილირების როლის შესწავლა აღნიშნული ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე და მისი დაღმავალი 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) ღას-პროტონკოცილის გამოყოფა და გასუფთავება.
- მიღებული გასუფთავებული ციტოზოლური პრეპარატის GTP--აზური აქტივობის შესწავლა ნიტროზილირების და ფარნეზილირების გავლენის ქვეშ.
- მიღებული გასუფთავებული მემბრანული პრეპარატის GTP--აზური აქტივობის შესწავლა მისი ნიტროზილირების პირობებში.
- ღას-პროტონკოცილის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენის დადგენა პროტეინკინაზების ფოსფორილირების დონეზე და შესაბამისად, პროტეინკინაზური კასკადების აქტივაციაზე.
- ღას-პროტონკოცილის ფარნეზილირების და ნიტროზილირების გავლენის შესწავლა ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობაზე.
- სავარაუდო სპეციფიკური დაღმავალი რეგულატორების დადგენა არამოდიფიცირებული, ნიტროზილირებული, ფარნეზილირებული და ორმაგად მოდიფიცირებული ღას-პროტონკოცილისთვის.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. შესწავლილია GTP-აზური აქტივობის ცვლილება პარალელურად მემბრანულ და ციტოზოლური ღას-პროტონკოცილის შემთხვევაში. პირველად არის ნაჩვენები ნიტროზილირების საპირისპირო ეფექტი GTP-აზურ აქტივობაზე მემბრანულ და ციტოზოლურ ღას-პროტონკოცილას შორის, რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს ცილის მოლეკულის 186-ე ცისტეინის ნაშთის მოდიფიცირების მნიშვნელობას. ნაჩვენებია ფარნეზილირების მასტიმულირებელი გავლენა ღას-პროტონკოცილის ბიოლოგიურ აქტივობაზე. პირველად ნერვული უჯრედის მაგალითზე ნაჩვენებია პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის (ნიტროზილირების და

ფარნეზილირების) გავლენა დას-პროტონკოცილის დადმავალი ეფექტორების (პროტინკინაზები, 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. დას-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. მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანია აგრეთვე ნეიროდეგენერაციული დაავადებების თერაპიაში, რადგან შეიძლება გამოყენებულ იქნას ისეთი ფარმაკოლოგიური საშუალებების დიზაინში, რომლებიც იმოქმედებენ დას-პროტონკოცილებზე და გადართავენ უჯრედულ სიგნალს ანტიაპოპტოზურ გზაზე.

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

დისერტაციის მასალების აპრობაცია. დისერტაციის მასალები მოხსენებული, განხილული და წარდგენილი იქნა:

- უჯრედული და განვითარების ბიოლოგიის XII სიმპოზიუმზე (2004წ., პეში, უნგრეთი)
- ევროპის ნეირომეცნიერების IV ფორუმზე (2004წ., ლისაბონი, პორტუგალია)
- ამერიკის ნეიროქიმიკოსთა საზოგადოების 35-ე წლიურ ყრილობაზე (2004წ. ნიუ იორკი, აშშ)
- ევროპის ნეირომეცნიერების V ფორუმზე (2006 წ., ვენა, ავსტრია)
- ამერიკის ნეიროქიმიკოსთა საზოგადოების 37-ე წლიურ ყრილობაზე (2006წ. პორტლანდი, აშშ)
- აზია-წყნარი ოკეანის ნეიროქიმიკოსთა საზოგადოების ყრილობაზე (2006 წ., სინგაპური)
- ევროპის ბიოქიმიკოსთა საზოგადოებების 31-ე კონგრესზე (2006 წ., ისტანბული, თურქეთი)
- ი.ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტის ნეიროქიმიკოსთა და ბიოქიმიკოსთა ნეიროფარმაკოლოგიის ლაბორატორიების გაერთიანებული სხდომაზე, რომელიც შედგა 2006 წლის 25 მაისს.

პუბლიკაციები: დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო სტატია და 7 თეზისი.

დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა. დისერტაცია წარმოდგენილია კომპიუტერზე ნაბეჭდ 101 გვერდზე და მოიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის მასალისა და მეთოდების აღწერას, მიღებული შედეგების განხილვას, დასკვნებსა და ბიბლიოგრაფიას (148 წყარო). ნაშრომი ილუსტრირებულია 18 სურათით და ერთი სქემით. ნაშრომი შესრულებულია ქართულ ენაზე.

კვლევის მასალა და მეთოდები.

ციტოპლაზმური Ras ცილის ქრომატოგრაფიული გასუფთავება ხარის თავის ტვინის ქერქიდან. ქრომატოგრაფიული გასუფთავების პროცესში გამოყენებული იყო შვიდი სახის ბუფერი: ბუფერი A – 25 mM TrisHCl pH 7.5, რომელიც შეიცავდა 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM მაგნიუმის ქლორიდი, 0.5 mM PMSF (ფენილმეთილსულფონილ ფლუორიდი), 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 1 mM 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 გლიცინი HCl 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 g, 10000g, 100000g-ზე. საბოლოო სუპერნატანტი დატანილი იყო DEAE-Servacell გელზე, რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ B-თი და რომლის ელუციაც ხდებოდა NaCl-ის საფეხურებრივი გრადიენტით ბუფერ B-ში თანმიმდევრულად 100 mM, 200 mM, 300 mM და 2M NaCl კონცენტრაციებით. მიღებულ ფრაქციებში განისაზღვრა GGTP-აზური აქტივობა. შემდგომი გასუფთავების დროს გამოყენებული იყო 300 mM 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 30 მლ/სთ სიჩქარეზე. ყოველი ფრაქცია წარმოდგენილი იყო 5 მლ მოცულობით, რომელშიც ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა. Sephadex G-75 სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ მეორე პიკზე ჩამოსული ფრაქციები დავიტანეთ Ras-ანტისხეულებით იმობილიზირებულ Sepharose სვეტზე (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. ანტიRas-Sepharose სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ პიკზე 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 50მლ/სთ სიჩქარეზე (0-დან 0,3 M). მიღებული ფრაქციები წარმოდგენილი იყო 1 მლ მოცულობის ოდენობით, რომელშიც

განსაზღვრული იყო GTP-აზური აქტივობა. მესამე, მთავარ პიკზე ჩამოსული აქტიური ფრაქციების გროვდებოდა, ლიოფილიზდებოდა და შეისწავლებოდა.

მემბრანასთან დაკავშირებული Ras ცილის გასუფთავება ხარის თავის ტვინის ქერქიდან. ხარის ტავის ტვინის ქერქი ჰომოგენიზირებული იყო ბუფერ A-ში 1:1-თან მოცულობით და შემდეგ დავაცენტრიფუგირეთ ორჯერ 2000g და 10000g-ზე, რის შედეგადაც მივიღეთ სინაპსური მემბრანები. მეორე ნალექი შევავროვეთ და მოვახდინეთ მემბრანების სოლუბილიზაცია 4,5%-იანი ნატრიუმის დეოქსიქოლატის 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 F ფრაქციები შევაერთეთ და დავიტანეთ ანტი-Ras-ანტისხეული-Sepharose სვეტზე (1x7სმ), რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ D-თი. ელუცია მიმდინარეობდა ბუფერ E-თი 15მლ/სთ სიჩქარეზე. ყოველი ეტაპის შემდეგ ვახდენდით Western blottings-ს და GTP-აზური აქტივობის განსაზღვრას. ჩამოსულ ფრაქციებში pH-ის გასაანეიტრალეზად თავდაპირველად დამატებული იყო ბუფერი F. მიღებული ფრაქციების დიალიზი ხდებოდა წყლის წინააღმდეგ, მთელი ღამის განმავლობაში. ეს სინჯები შემდგომში დავიტანეთ Mono Q HR5/5 სვეტზე, რომელიც გაწონასწორებული იყო ბუფერ G-თი, და 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.

მიღებული ცილების ფრაქციების ანალიზი ხდებოდა პოლიაკრილამიდის გელზე ბრტყელი გელის „Phast System Separation” აპარატზე (*Pharmacia*, შვედეთი).

GTP-აზური აქტივობის განსაზღვრა. 10 მკლ ცილის ხსნარი (70 μ g) პრეინკუბირებული იყო [8¹⁴-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 ხარის შრატის ალბუმინს და 1 nM EDTA. GTP-აზური რეაქციების ინიციაცია ხდებოდა MgCl₂-ის დამატებით (5mM). სინჯარიდან ვიღებდით 10 მკლ და [8¹⁴-C]-GDP პროდუქციას ვზომავდით თხელშრიანი ქრომატოგრაფიით PEI(პოლიეთილენიმინი)-ფირფიტაზე. ნუკლეოტიდების დაყოფა ხდებოდა (0,75M) კალიუმ-ფოსფატურ ბუფერში (pH3,5). GDP-ის რაოდენობა ისაზღვრებოდა სცინცილატორულ მთვლელში და GTP-აზური გაზომვის ექსპერიმენტული ცდომილება იყო 10-დან 20%-მდე.

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

რეაქციის ინიცირება 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 ვილებდით 10-10 μ l, რომელსაც ვაწვეთებდით PEI ფირფიტაზე.

გასუფთავებული Ras ცილის *in vitro* ნიტროზილირება. გასუფთავებული Ras ცილის ნიტროზილირებას ვახდენდით Williams-ის მიხედვით [Williams et al, 2003]. სარეაქციო არე შეიცავდა Ras ცილის ხსნარს (30მგ/მლ), S-ნიტროცისტეინს (0,6mM), 10mM მაგნიუმის ქლორიდს, 5mM DTT, 50mM HEPES, pH-7,5. პარალელურ ექსპერიმენტებში დამატებული იყო FTase (100nM) და ფარნეზილპროფოსფატი (50nM). რეაქციის ინიცირება ხდებოდა Ras ცილის დამატებით. საკონტროლო ექსპერიმენტები ტარდებოდა Ras ცილის ნაცვლად ფერმენტული ბუფერის დამატებით. GTP-აზური აქტივობის გასაზომად 0, 20, 40, 60 წუთის ინტერვალებით ვილებდით 10 მკლ ხსნარს და ვაწვეთებდით PEI ფირფიტაზე.

პირველადი შერეული გლია/ნეირონული კულტურა მიღებული იყო ახალშობილი ვირთაგვების თავის ტვინიდან [Miyamoto et al., 1989]. უჯრედების დისოციაცია ხდებოდა DMEM-ში (დულბეკოს მოდიფიცირებული იგლის არე), რომელიც შეიცავდა 10% ჩანასახოვანი ხარის შრატს (FBS) და 2 mM L-გლუტამინს, 30 წუთიანი მონელების შედეგად 0.027% ტრიფსინის ხსნარში.

უჯრედული კულტურების გაზრდა ხდებოდა ინკუბატორში 37°C ტემპერატურაზე 5% CO₂-ის პირობებში DMEM (დულბეკოს მოდიფიცირებული იგლის არე), საკვები არის გამოყენებით. ინკუბაცია აქტიურ ნაერთებთან (L-NAME საბოლოო კონცენტრაციით 1mM, მანუმიცინი საბოლოო კონცენტრაციით 1 μ M) ხდებოდა 24 საათის განმავლობაში, რის შემდეგაც ამ უჯრედული სუსპენზიისაგან მიიღებოდა ციტოპლაზმური და ბირთვული ექსტრაქტები.

ციტოპლაზმური და ბირთვული ექსტრაქტების მიღება [BD Mercury Protocol]. შესაბამის ნაერთებთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ არსებულ უჯრედულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 5 წუთი 450g-ზე. ნალექს ვუმატებდით ორჯერ მეტი მოცულობით ლიზისის ბუფერს (1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM DTT, ლეუპეპტინი, აპროტინინი, 10mM HEPES, pH7,9). უჯრედების გახეთქვას ვაწარმოებდით №127 ნემსით ათჯერადი გატარებით. მიღებულ ჰომოგენატს ვაცენტრიფუგირებდით 20 წუთი 10000g-ზე და ვინახავდით ცალკე სინჯარებში 4°C-ზე, როგორც ციტოზოლურ ფრაქციას. დარჩენილ ნალექს ვუმატებდით იგივე მოცულობის ბირთვული ექსტრაქციის ბუფერს (1.5mM MgCl₂, 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 ვაცენტრიფუგირებდით 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.

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

ტრანსკრიფციის ფაქტორების დონის განსაზღვრა: ბირთვულ ექსტრაქტში ხდებოდა BD Mercury TM TransFactor Kit-ის გამოყენებით, როგორც აღწერილია ფირმამწარმოებლის ინსტრუქციაში [BD Mercury Protocol].

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.

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

1. 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 ფარნეზილტრანსფერაზა, რომელიც აკატალიზებს თიოეთერული ბმით დაკავშირებული ფარნეზილის ჯგუფის გადატანას ფარნეზილპიროფოსფატიდან 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].

Ras-პროტოონკოცილის 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 გამოსაკვლევადა, მოვახდინეთ Ras-ცილის გასუფთავება და მისი სუფთა პრეპარატის სახით მიღება. რამდენიმე ქრომატოგრაფიული საფეხურის გამოყენებით გავასუფთავეთ ციტოპლაზმური და მემბრანასთან დაკავშირებული Ras-ცილები ხარის თავის ტვინიდან. ხარის თავის ტვინის ქერქის ქსოვილი ჰომოგენიზირებული იყო,

საფეხურებრივი დაცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული ციტოზოლური და მემბრანული ფრაქციების 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 მიღებული ფრაქცია. ეს ფრაქცია დატანილი იყო Sephadex G-75 სვეტზე. Sephadex G-75 სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ მეორე პიკზე ჩამოსული აქტიური ფრაქციები (სურათი 1) დატანილი იყო ანტიRas-ანტისხეული-დაკავშირებული Sepharose-ის სვეტზე. ანტიRas-ანტისხეულ-დაკავშირებულ Sepharose-ის სვეტზე ჩატარებული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებულ პიკზე ჩამოსული ფრაქციები შემდეგ ეტაპზე დატანილ იქნა Mono Q-ს HR5/5 სვეტზე და ჩატარდა პირველ, მთავარ პიკზე ჩამოსული აქტიური ფრაქციების ლიოფილიზაცია და ელექტროფორეზული შესწავლა (სურათი 2).

საბოლოოდ მიღებული, გასუფთავებული პრეპარატების (ციტოპლაზმური და მემბრანული) სისუფთავის დასადგენად ვატარებდით SDS-ელექტროფორეზულ ანალიზს პოლიაკრილამიდის გელზე, შედეგა ხდებოდა ვერცხლის ნიტრატით (სურათი 3). ცილების GTP-აზური აქტივობა ისაზღვრებოდა დროზე დამოკიდებულ დინამიკაში და იზომებოდა ინკუბაციის ერთ საათიანი პერიოდის განმავლობაში. ციტოპლაზმური Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა უდრიდა დაახლოებით $6,5 \pm 0,4$ პმოლი/მგ/წთ, როდესაც მემბრანასთან დაკავშირებული Ras-ცილის აქტივობა ტოლი იყო $18,7 \pm 0,9$ პმოლი/მგ/წთ ჩვენი ექსპერიმენტების პირობებში.

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, ხოლო Ras-ცილის ფარნეზილირება იწვევდა GTP-აზური აქტივობის მნიშვნელოვან ინჰიბირებას (სურათი 4).

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 $5,4 \pm 0,4$ პმოლი/მგ/წთ, როდესაც ნიტროზილირებული Ras-GTP-აზური აქტივობა საკონტროლო ექსპერიმენტთან შედარებით საკმაოდ გაზრდილი იყო და $9,8 \pm 0,6$ პმოლი/მგ/წთ 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-ნიტროზოცისტეინთან ინკუბირების შემდეგ (სურათი 5). ნიტროზილირებული, მემბრანასთან დაკავშირებული Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა შემცირდა საკონტროლო პრეპარატთან შედარებით 73%-მდე და ტოლი იყო $13,6 \pm 0,6$ პმოლი/მგ/წთ. ეს შედეგები ადასტურებენ მოსაზრებას, რომ ცისტეინის სხვადასხვა ნაშთები ციტოპლაზმურ და მემბრანასთან დაკავშირებულ Ras-ცილებში განიცდიან ნიტროზილირებას და ასეთი მრავალმხრივი მოდიფიკაციები შესაძლოა არეგულირებენ GTP-აზურ აქტივობას.

მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ციტოპლაზმური (დეფარნეზილირებული) Ras-ცილის ნიტროზილირება იწვევს GTP-აზური აქტივობის მნიშვნელოვან სტიმულაციას. შესაბამისად დადგინდა, რომ Ras-ცილის GTP-აზური აქტივობა ინჰიბირდებოდა ფარნეზილირებით და აქტივობის დონე ნაწილობრივ აღდგებოდა NO-ს დონორის არსებობის პირობებში (Cys-NO). მიღებული 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 გააქტიურებას GTP-ის დაკავშირებით და ინაქტივირდება GDP-ის დაკავშირების შემდეგ, უნდა დავუშვათ Ras-ცილის გააქტივებაში მალმიტირებელ 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 C-ბოლოს 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 ეფექტურია სხვადასხვა ჰემატოლოგიური ავთვისებიანი სიმსივნეების მკურნალობაში [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 ჩვენ აღმოვაჩინეთ, რომ NO-დონორი იწვევს GTP-აზური აქტივობის ინჰიბირებას და აძლიერებს Ras-თან GTP-ის დაკავშირების ხანგრძლივობას. უნდა აღინიშნოს, რომ ras გენის წერტილოვანი მუტაციები, უპირატესად დომინანტ-ონკოგენის მუტაციის სახით, ნაპოვნია ადამიანის სიმსივნეებში. 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 გვაძლევს 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 C-ბოლოს კარბოქსიმეთილირების და მემბრანაში გადასვლის პრევენციას, აგრეთვე ციტოპლაზმური Ras-ის აქტიური GTP-თან დაკავშირების პერიოდის შემცირებას. საპირისპირო შეიძლება ითქვას მემბრანა დაკავშირებულ Ras-ზე, რომელიც ნიტროზილირდება Cys-118-ზე და მიღებული მოდიფიკაცია ამცირებს GTP-აზურ აქტივობას ანუ ამ შემთხვევაში 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, რადგან მისი აქტივაცია უჯრედის ფუნდამენტურ ცვლილებებთან არის დაკავშირებული. Ras-ცილა, რომლის გენის მუტაციაც განაპირობებს ონკოგენურ ტრანსფორმაციას, იწვევს ერთის მხრივ უჯრედების აპოფტოზს, ხოლო მეორე მხრივ სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას. Ras-ის ასეთი ორმაგი მოქმედება განისაზღვრება მისი დადმავალ რეგულაციურ სისტემებზე ზემოქმედების მიმართულებით [Crespo et al. 2000]. Raf/MEK/ERK გზის გააქტივებით Ras 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 ჩვენს მიერ შესწავლილი იყო Ras დადმავალი ეფექტორების აქტივობები. Ras დამოკიდებული დადმავალი გზის დასახასიათებლად და მასზე მისი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენის დასადგენად გამოვიყენეთ ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორი მანუმინინი და NO-სინთაზას ინჰიბიტორი L-NAME. როგორც ცნობილია მანუმინინის მაინჰიბირებელი ეფექტი ფარნეზილტრანსფერაზაზე ხორციელდება მისი სუბსტრატთან ფარნეზილპიროფოსფატის კონკურენციის გზით და ფართოდ გამოიყენება Ras-სასიგნალო გზის დასახასიათებლად.

თავდაპირველად იყო შესწავლილი მოდიფიკაციების ინჰიბიტორების გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე და სამი ცენტრალური პროტეინკინაზური კასკადის (Akt, ERK და JNK) აქტივაციაზე. დადგინდა, რომ არც მანუმინინს და არც L-NAME-ს არა აქვს მნიშვნელოვანი აპოპტოზური ეფექტი გლია-ნეირონულ უჯრედებზე. აღმოჩნდა, რომ მანუმინინსა და L-NAME-ს თანადროული ან ცალკეული ზემოქმედების შედაგად მცირდება Akt-ს ფოსფორილირების ხარისხი, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ შიდაუჯრედული NO-ს კონსტიტუციური დონე და ფარნეზილტრანსფერაზას ფიზიოლოგიური აქტივობა აუცილებელია PI3-კინაზა/Akt-გზის ჩართვისთვის (სურათი 6). უფრო მეტიც, გაირკვა, რომ მანუმინინი L-NAME-ს მსგავსად ზრდის ERK-ს ფოსფორილირების 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 6). ეს მონაცემები მიუთითებენ იმაზე, რომ ფარნეზილირების ინჰიბირება და NO-ს კონცენტრაციის შემცირება ერთდროულად არ ცვლის ERK-ს ფოსფორილირების ხარისხს.

შემდგომ ექსპერიმენტებში გაირკვა, რომ მანუმიცინი არ ცვლის 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 6), 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 პროტოონკოცილ წარმოადგენს.

ცნობილია, რომ Raf/MERK/ERK და PI3-კინაზა/Akt სასიგნალო გზები ზემოქმედებენ ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობაზე, მათ შორის c-Fos, c-Jun, NF-κB, STAT, ATF-2, CREB და Sp1 [Garrington, 1999] და ამგვარად ახდენენ თავის ეფექტს გენთა ექსპრესიაზე. ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტების შემდგომ სერიებში განსაზღვრული იყო 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 აქტივობა იზრდება (სურათი 7). ეს მიუთითებს იმაზე, რომ ფარნეზილირებული და ნიტროზილირებული Ras-ი ამცირებს c-Fos-ის აქტივობას. გარდა ამისა აღმოჩნდა, რომ უჯრედში L-NAME-ს დამატება იწვევს STAT-ის აქტივობის შემცირებას (სურათი 8), რაც მეტყველებს იმაზე, რომ NO-ს კონსტიტუციური დონე აუცილებელია STAT-ის მოქმედებისათვის. მანუმიცინის ცალკეული დამატება არავითარ ეფექტს არ ახდენს, თუმცა მოცემული ანტიბიოტიკი ხსნის L-NAME-თი გამოწვეული STAT-ის აქტივობის დნმ-თან დაკავშირების ინჰიბირებას.

შემდგომ ექსპერიმენტებში დადგინდა, რომ L-NAME დამატება უჯრედული კულტურის საკვებ არეში ოდნავ ამცირებს Sp1-ის აქტივობას და მანუმიცინის თანაობისას ტრანსკრიფციული ფაქტორების დნმ-თან დაკავშირების აქტივობა აღდგება საკონტროლო დონემდე (სურათი 9). საინტერესოა ის ფაქტი, რომ L-NAME-ს მსგავსად მანუმიცინიც ამცირებს NF-κB-ს აქტივობას, რაც მიგვითითებს იმაზე, რომ NO-ს კონსტიტუციური დონე და ფარნეზილირებული Ras აუცილებელია NF-κB-ს ტრანსკრიფციული აქტივობისათვის (სურათი 10).

ექსპერიმენტების შემდგომ სერიაში გაირკვა მანუმიცინის და L-NAME-ს დამთრგუნველი მოქმედება c-Jun-ის აქტივობაზე და ის ეფექტიც, რომ მანუმიცინი და L-NAME ერთად არ მოქმედებენ აღნიშნული ტრანსკრიფციული ფაქტორის აქტივობაზე (სურათი 11). მეორეს მხრივ, აღმოჩნდა, რომ L-NAME ზრდის ATF-2-ის აქტივობას, ხოლო მანუმიცინი ხსნის L-NAME-ს გამააქტივებელ ეფექტს. ამგვარად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ATF-2-ის აქტივაციას განაპირობებს დენიტროზილირებული და ფარნეზილირებული Ras. აგრეთვე დადგინდა, რომ მანუმიცინი ზრდის JunD-ს

აქტივობას, ხოლო L-NAME ხსნის ამ ეფექტს (სურათი 12). ზემოთ აღნიშნული ფაქტორი მაქსიმალურ აქტივობას ამჟღავნებს ნიტროზილირებულ და დეფარნეზილირებულ მდგომარეობაში. რაც შეეხება CREB ტრანსკრიფციულ ფაქტორს, მისი აქტივობის დონე უჯრედში არ განიცდის სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებებს.

ამ გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობა დამოკიდებულია NO-ს შიდაუჯრედულ დონეზე და ცილის ფარნეზილირებაზე. მიღებულმა მონაცემებმა 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. ხოლო Akt ფოსფორილირებასა და განსაზღვრულ ტრანსკრიფციის ფაქტორებს შორის არავითარი კორელაცია არ იყო ნაპოვნი.

ამრიგად, ჩვენი მონაცემების თანახმად, აზოტის ოქსიდის ცვლილებები და ფარნეზილირების ინჰიბირება ცვლის ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობას. დადგინდა, რომ მანუმიცინით გამოწვეული ფარნეზილირების ინჰიბირება ამცირებს NF- κ B-ს დნმ-თან დაკავშირების აქტივობას, არ ცვლის STAT, ATF-2, CREB, Sp1 დნმ-თან დაკავშირებას და ზრდის c-Fos, JunD, c-Jun-ის აქტივობას. მოცემულ პირობებში Akt-ს ფოსფორილირების ხარისხი შემცირებულია, ხოლო 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 უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის ზრდიდან მის პროგრამირებულ სიკვდილზე და პირიქით. იგი წარმოადგენს ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორის მთავარ სამიზნეს [Jiang 2000]. ნეირონებში Akt 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]. ასე, რომ Ras-ის ფარნეზილირების დაინჰიბირებამ და შესაბამისად Akt-ს აქტივობის შემცირებამ შეიძლება გაააქტივოს c-Jun. 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-ის 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 მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს ნეირონების დიფერენცირებასა და აპოფტოზურ გზებს შორის და დამოკიდებულია JNK აქტივობაზე [Leppa 2000]. რადგან წინამდებარე ექსპერიმენტებში მანუმიცინ-დამოკიდებული JNK აქტივობის ცვლილება არ შეიმჩნეოდა, მიღებული მონაცემების შედეგად შეიძლება დადგინდეს, რომ AP1 კომპლექსში ATF-2-ის შემცველობა ცვლილებებს არ განიცდის.

ჩვენი მონაცემების საფუძველზე დადგინდა, რომ მანუმიცინის მოქმედებით NF-κB დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა მცირდება, რაც მიუთითებს ფარნეზილირების მნიშვნელობაზე, და შესაძლოა შესაბამისად მეთილირების მნიშვნელობაზე და Ras-ის მემბრანაში გადაადგილების აუცილებლობაზე NF-κB ბიოლოგიურ ფუნქციაში. NF-κB-ს დნმ-თან დაკავშირების შემცირება კორელირებს Akt-ს ფოსფორილირების შემცირებასთან და არ კორელირებს JNK და ERK ფოსფორილირებასთან. უნდა აღინიშნოს, რომ NF-κB-ს მაინჰიბირებელი ცილა IκB შესაძლებელია ფოსფორილირდეს ERK და Akt პროტეინკინაზებით [Celec 2004], მაგრამ ნეირონებში Ras/PI3/Akt გზა აუცილებელია NF-κB სრული გააქტივებისათვის [Lilienbaum, 2000]. ჩვენი მონაცემები სრულიად ეთანხმება ზემოთხსენებულ მონაცემებს.

NO შესაძლოა მონაწილეობდეს ტრანსკრიფციის რედაქს კონტროლში ისეთი ტრანსკრიფციის ფაქტორების დნმ-დაკავშირებული აქტივობის რეგულირების გზით, როგორებიც არიან 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 დნმ-თან დაკავშირების უნარი აღდგება ნორმალურ დონემდე მანუმიცინის არსებობის პირობებში, რაც მიგვითითებს იმაზე, რომ ცილის თანადროული ფარნეზილირება და ნიტროზილირება ცვლის Ras-ით კონტროლირებადი დაღმავალი გზების მიმართულებას. მეტიც, c-Fos-ის და JunD დნმ-დაკავშირების აქტივობის გაზრდა ERK-ს ფოსფორილირებასთან ერთად აღინიშნება L-NAME-ს თანაობისას. ცნობილია, რომ L-არგინინის კონსტიტუციური 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.

Sp1 და Sp3 წარმოადგენენ თუთიის თითებიან D დნმ-აქტივირებად ცილებს, რომლებიც მონაწილეობენ უჯრედისათვის დამახასიათებელი სპეციფიკური გენების ექსპრესიაში, რაშიც იგულისხმება აგრეთვე ლიგანდ-დამოკიდებული იონური არხების სუბერთეულების ნეიროსპეციფიკური გენების ტრანსკრიფციული რეგულაცია [Melnikova 2001, Mao 2002]. ოქსიდაციური სტრესი მნიშვნელოვნად ზრდის Sp1 და Sp3 ცილების დონეს და დნმ-თან დაკავშირებას და Sp1 და Sp3 გაძლიერებული ექსპრესია აძლიერებს ქერქის ნეირონების სიცოცხლისუნარიანობის ზრდას [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-ს დნმ-თან დაკავშირებას და ეს შემცირება კორელირებს Akt-ს აქტივობის კლებასთან. მეორე ტრანსკრიფციული ფაქტორი, რომლის აქტივობაც ქვეითდება L-NAME-ს მოქმედებით, არის STAT-1. JAK-სიგნალის გადამცემები და ტრანსკრიფციის სიგნალის აქტივატორები (JAK-STAT) წარმოადგენს ანთებითი პროცესების მიმდინარეობის ძირითად გზას, რომელსაც მიყვავართ 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

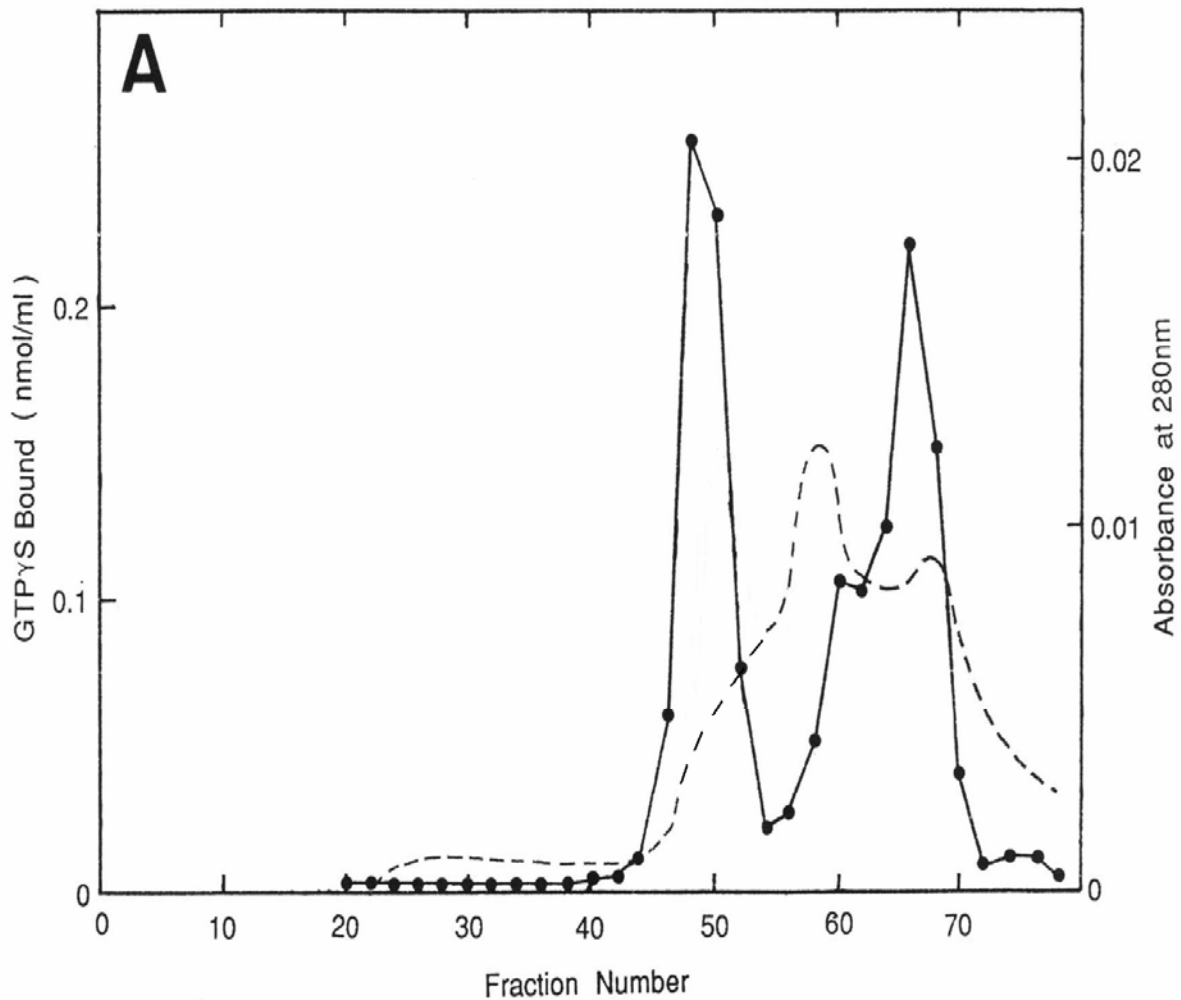
შედეგად იწვევს ERK-ს ფოსფორილირებას, რაც მიუთითებს JAK და ERK გზების გადაკვეთაზე [Kim 2002]. მეტიც, JAK პირდაპირ ჩართულია Pyk2-კინაზით სტიმულირებული Ras-MAPK გზის გააქტივებაში და იწვევს c-fos და c-myc გენების ჩართვას [Miyazaki 1998]. ნუნახია, რომ გლია-ნეირონულ პრეპარატებში მანუმიცინი არ ცვლის STAT აქტივობას, მაგრამ აღადგენს L-NAME-ით გამოწვეულ ეფექტს. ზემოთ აღნიშნული მონაცემების თანახმად, ზოგიერთი ტრანსკრიფციული ფაქტორის აქტივობა იცვლება NO-ს დონისა და ფარნეზილირების ინჰიბირების შედეგად. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანია შემდგომი შესწავლისთვის, რომელიც ბოლომდე გაარკვევს Ras-ის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების როლის დადამავალი სასიგნალო კასკადების სპეციფიკურობაზე და ფიზიოლოგიურ პასუხზე.

დასკვნები:

1. Ras-პროტოონკოცილის 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 დადამავალი 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- κ B. მემბრანაში ჩართული, მაგრამ არანიტროზილირებული Ras-ის ძირითადი ეფექტორები არიან ATF-2 და JunD.
6. ციტოპლაზმური ნიტროზილირებული Ras-ის ძირითად დადამავალ 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 ტრანზიტორული ხასიათი უნდა ჰქონდეს.
7. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Ras-ცილის ფარნეზილირება და ნიტროზილირება განაპირობებს მისი GTP-აზური აქტივობის რეგულაციას და დადამავალი ეფექტორების სპეციფიკურობის შეცვლას.

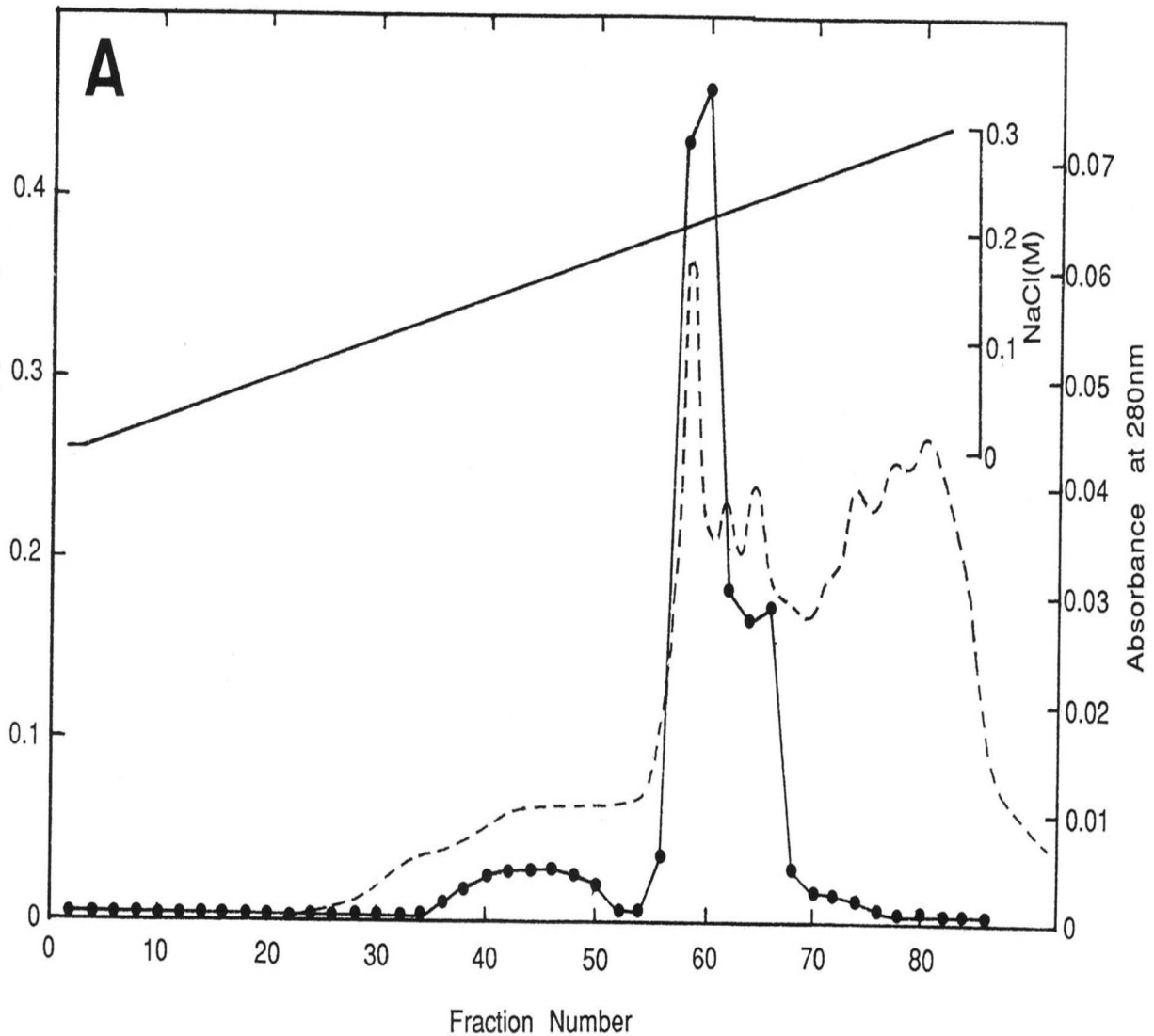
დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომები:

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*; 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.** 31st *FEBS Congress, FEBS Journal*, 2006, 273(s1): 82
10. Barbakadze T., Zhuravliova E., Sepashvili M., Narmania N. and Mikeladze D.G. **Farnesylation and nitrosylation change the intrinsic GTP-ase activity of p21^{Ras}.** *Journal of Neurochemistry* 2006, **98** (s1), 121-126.



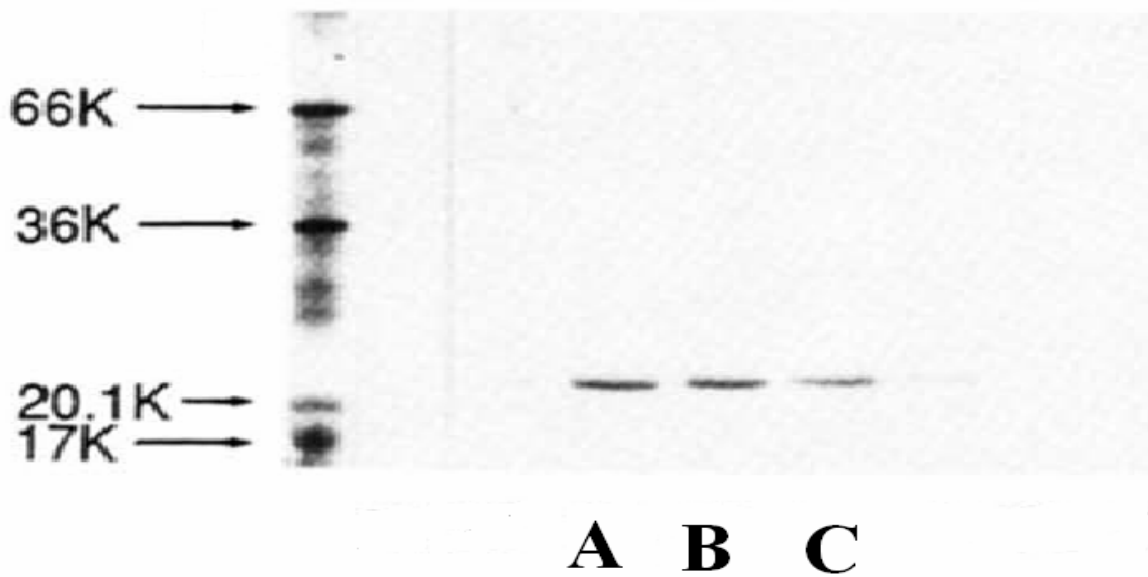
სურათი 1. Sephadex G-75 გელ-ფილტრაციის სვეტიდან ჩამოსული ელუატების ქრომატოგრამა. ცილის კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა გამდინარე სპექტოფოტომეტრით 254ნმ სიგრძის ტალღაზე. ყოველი ფრაქცია წარმოდგენილი იყო 5ml მოცულობით, რომელშიც ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა

Рисунок 1. Хроматограмма элюатов, полученных с Sephadex G-75 гельфильтрационной колонки. Концентрация белка определялась с помощью проточного спектрофотометра при длине волны 254нм. Объем каждой фракций составлял 5 мл, в которых определялась ГТФ-азная активность.



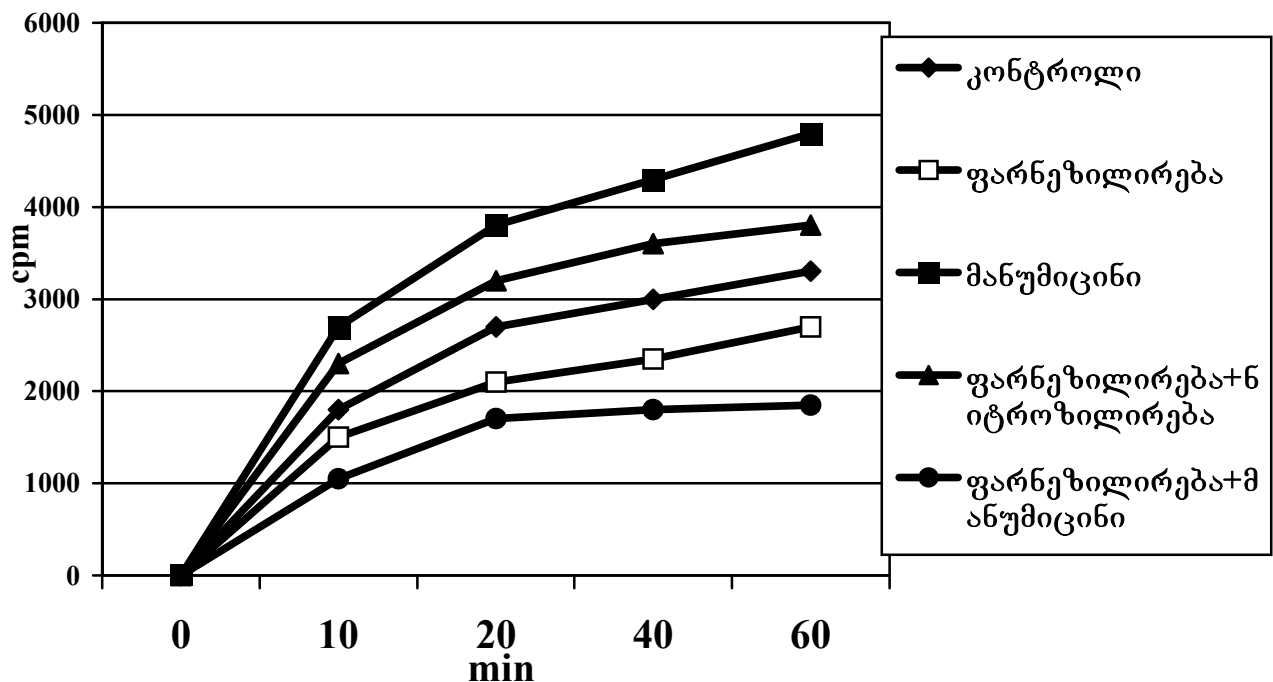
სურათი 2. MonoQ (HR5/5) იონ-ცვლადი სვეტიდან ჩამოსული ელუატების ქრომატოგრამა. ცილის კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა გამდინარე სპექტოფოტომეტრით 254ნმ სიგრძის ტალღაზე. ყოველი ფრაქცია წარმოდგენილი იყო 1ml მოცულობით, რომელშიც ისაზღვრებოდა GTP-აზური აქტივობა.

Рисунок 2. Хроматограмма элюатов, полученных с MonoQ (HR5/5) ионообменной колонки. Концентрация белка определялась с помощью проточного спектрофотометра на длине волны 254нм. Каждая фракция составляла объемом 1 мл, в которых определялась ГТФ-азная активность.



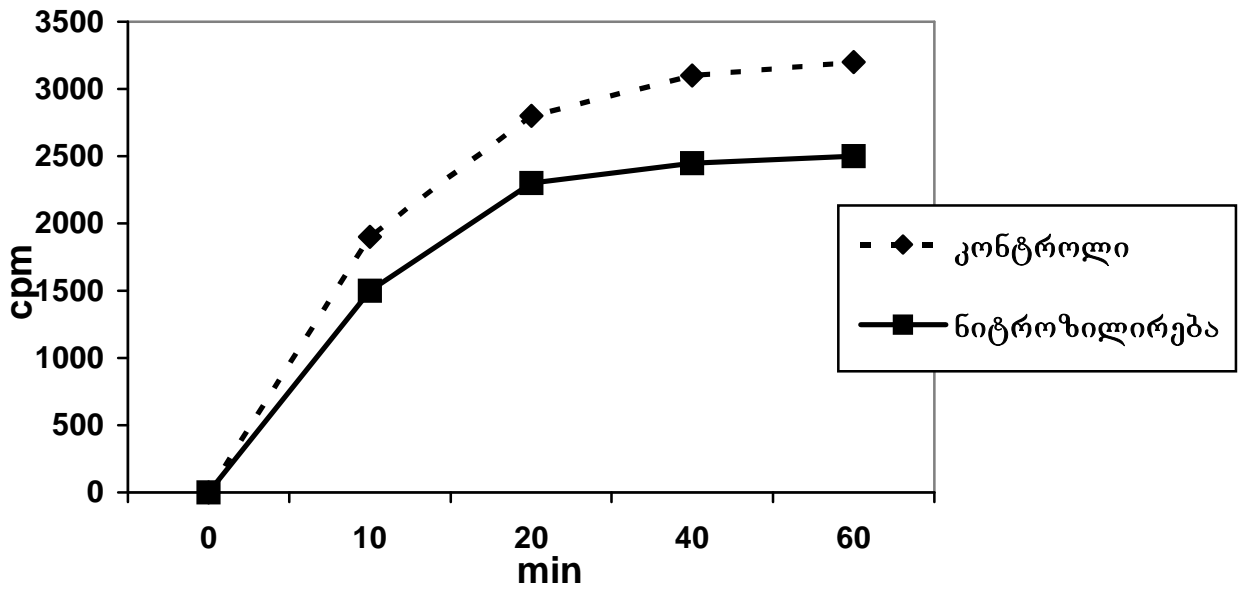
სურათი 3. Mono Q (HR5/5) სვეტიდან ჩამოსული ელუატის ელექტროფორეზული ანალიზი SDS-პოლიაკრილამიდის გელზე. მარცხნივ-მარჯვრული ცილები,...A – ციტოზოლური პრეპარატი, B- მემბრანული პრეპარატი, C – სტანდარტული ცილა - ტრიფსინის ინჰიბიტორი (Sigma, USA). დატანილი ცილის რაოდენობა შეადგენდა 5მგ.

Рисунок 3. Электрофоретический анализ элюатов, полученных с Mono Q (HR5/5). Левая дорожка – маркерные белки, А – цитозольный препарат, В – мембранный препарат, С – стандартный белок – ингибитор трипсина (Sigma, USA).



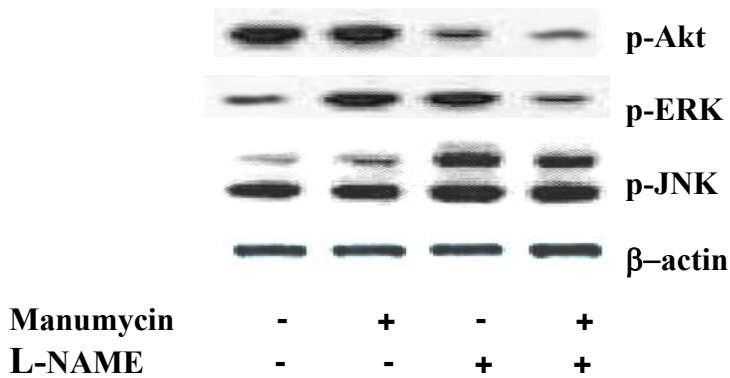
სურათი 4. ფარნეზილირებისა და ნიტროზილირების გავლენა ციტოზოლური Ras ცილის GTP-აზურ აქტივობაზე

Рисунок 4. Влияние фарнезилирования и нитрозилирования цитоплазматического Ras белка на его ГТФ-азную активность



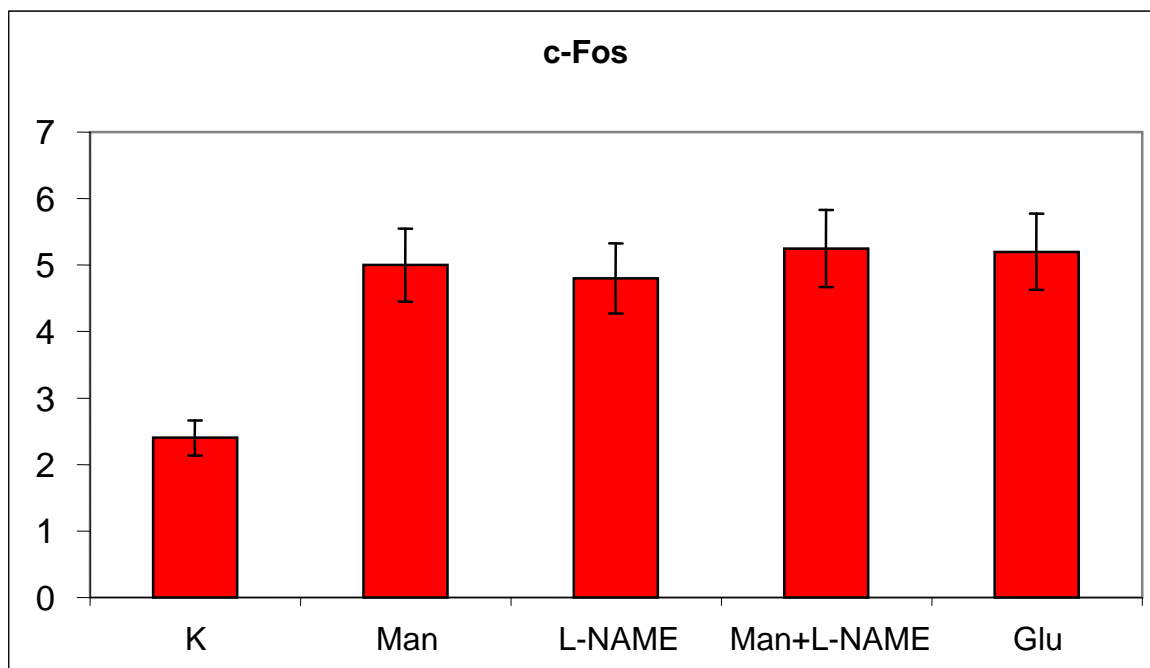
სურათი 5. ნიტროზილირების გავლენა მემბრანასთან დაკავშირებულ Ras ცილაზე.

Рисунок 5. Влияние нитрозилирования мембрана-связанного Ras белка на его ГТФ-азную активность



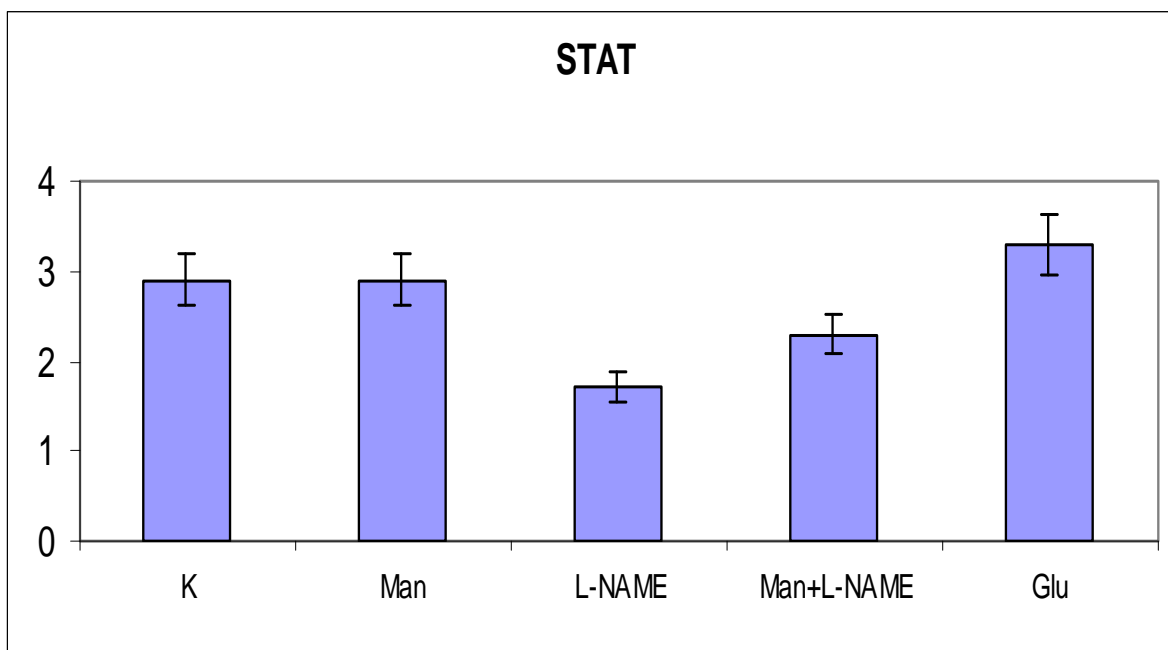
სურათი 6. Akt, ERK და JNK-ს ფოსფორილების დონის ცლილება მანუმიცინთან (10 μM) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად (Western Blotting ანალიზი) სურათი წარმოდგენილია სამი ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი ცდის საფუძველზე.

Рисунок 6. Изменение уровня фосфорилирования Akt, ERK и JNK протеинкиназ в результате 24-часовой инкубации с манумицином (10 μM) и L-NAME (1 mM) (Western Blotting анализ). Картина фореца представлена на основе данных трех независимых экспериментов.



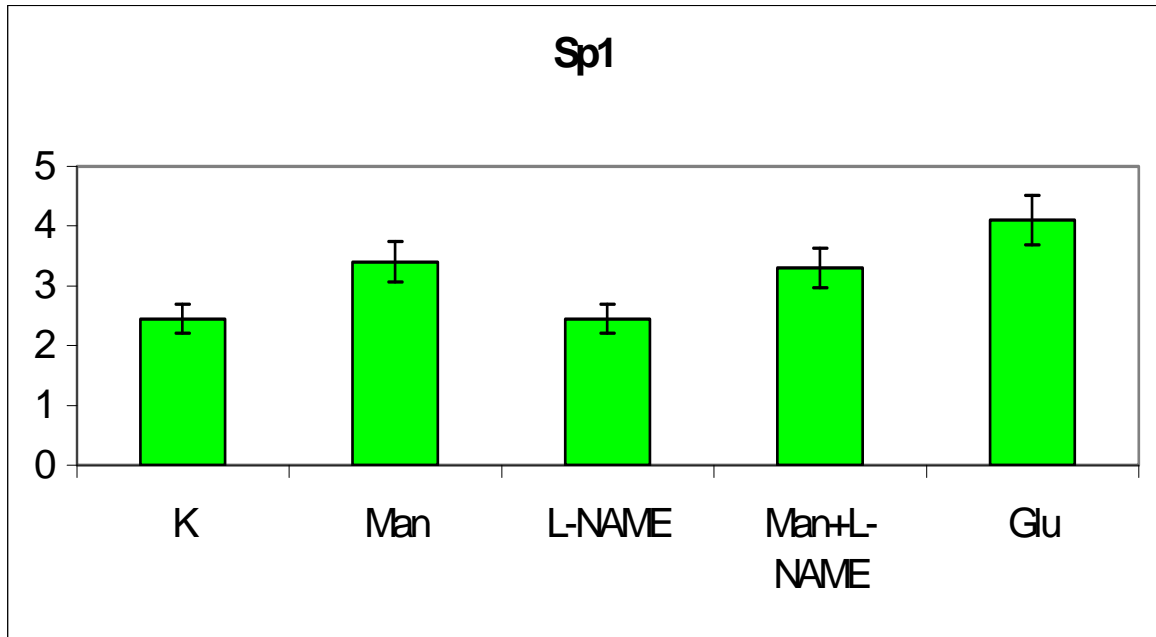
სურათი 7. c-Fos-ის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μM) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A_{450} მკგ ცილაზე.

Рисунок 7. Изменение ДНК-связывающей активности c-Fos фактора в результате 24 часовой инкубации с манумицином (10 μM) и L-NAME (1 mM). Данные приведены в A_{450} на мкг белка.



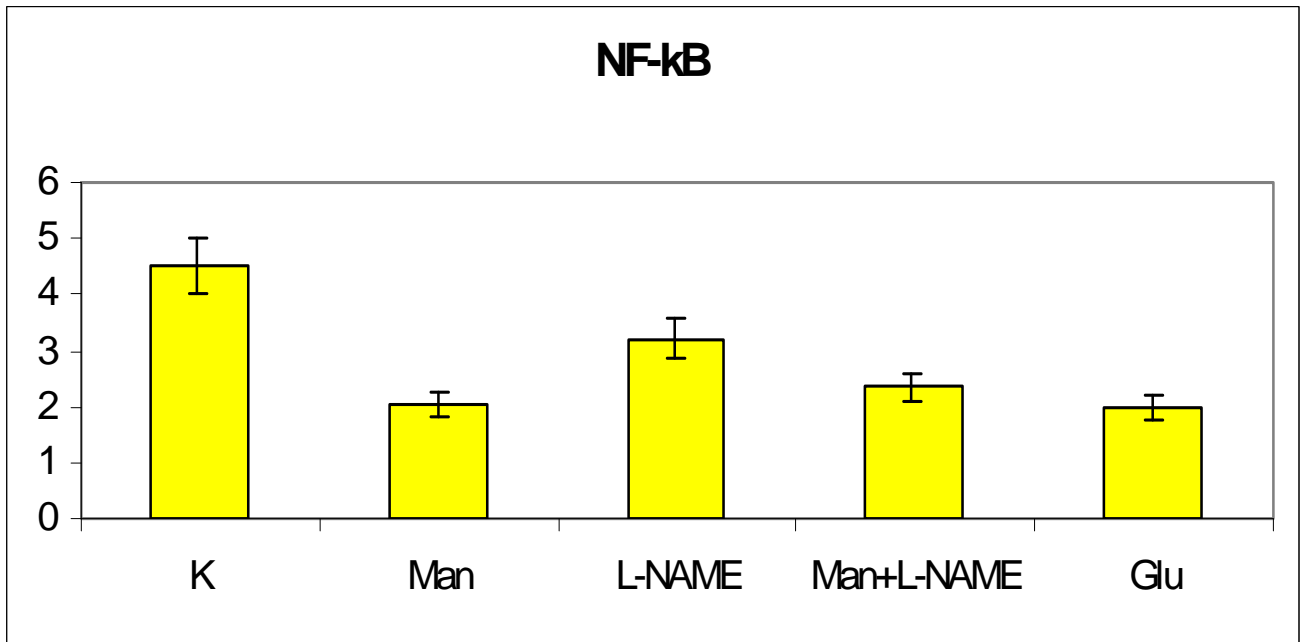
სურათი 8. STAT-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μM) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A_{450} მკგ ცილაზე.

Рисунок 8. Изменение ДНК-связывающей активности STAT фактора в результате 24 часовой инкубации с манумицином (10 μM) и L-NAME (1 mM). Данные приведены в A_{450} на мкг белка.



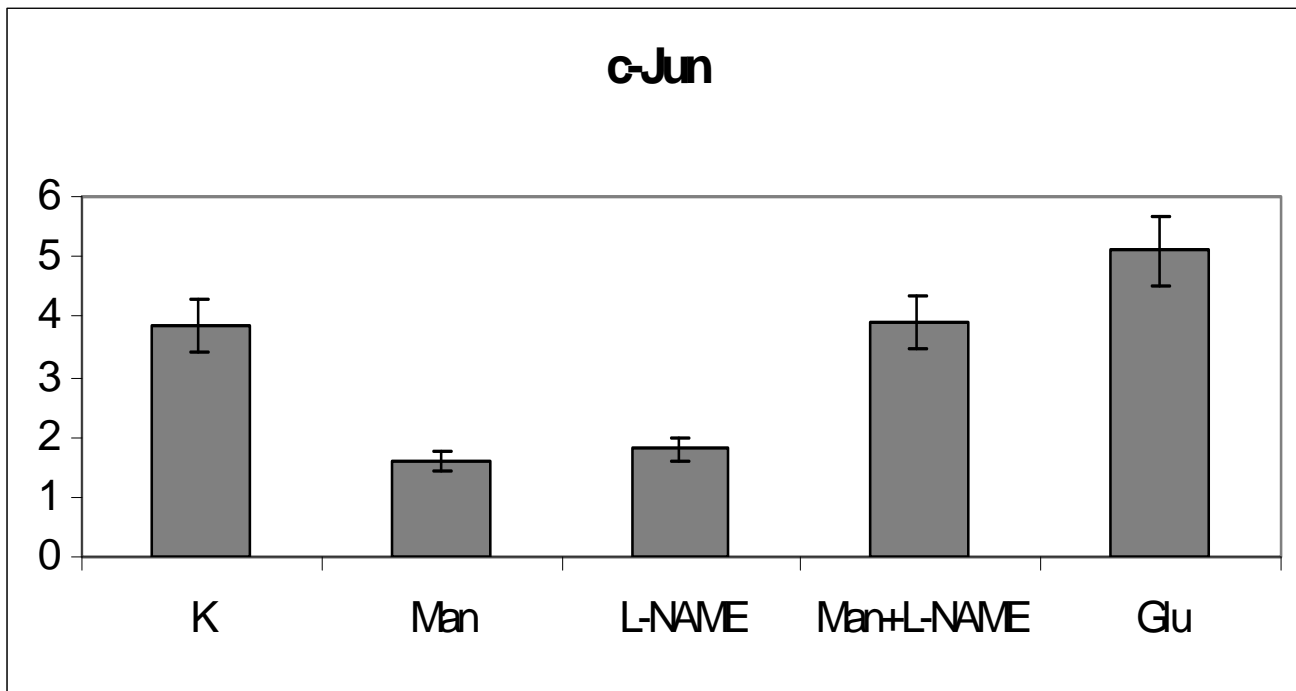
სურათი 9. SP-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μM) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A₄₅₀ მკგ ცილაზე.

Рисунок 9. Изменение ДНК-связывающей активности SP фактора в результате 24 часовой инкубации с манумицином (10 μM) и L-NAME (1 mM). Данные приведены в A₄₅₀ на мкг белка.



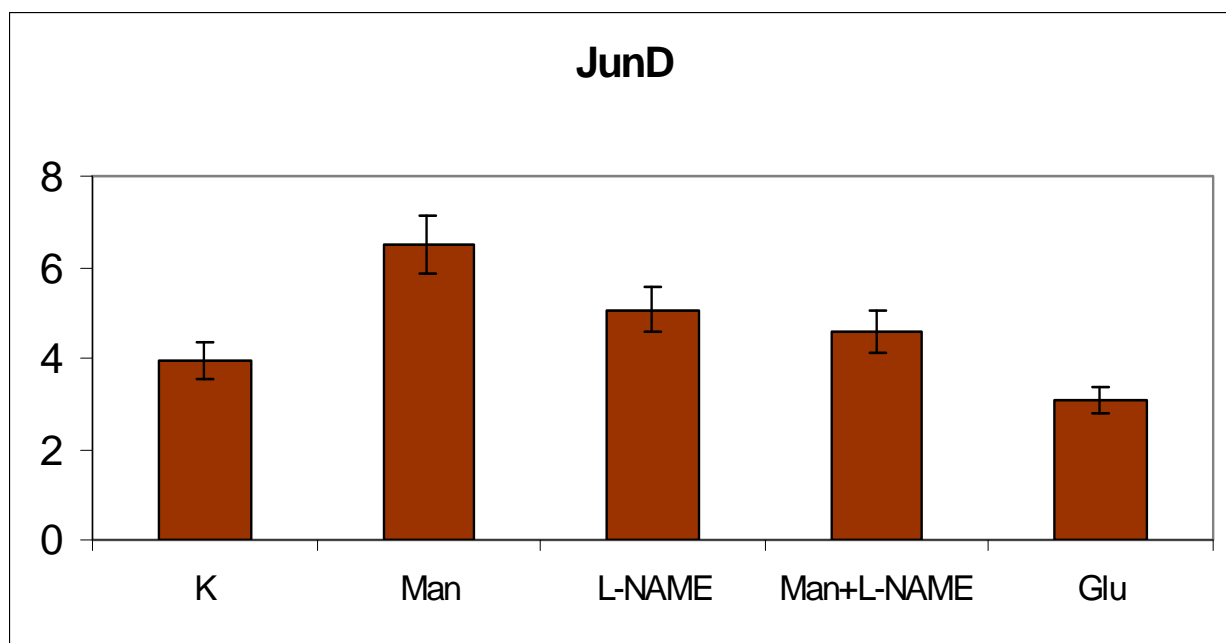
სურათი 10. NF-κB-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μM) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A₄₅₀ მკგ ცილაზე.

Рисунок 10. Изменение ДНК-связывающей активности NF-κB фактора в результате 24 часовой инкубации с манумицином (10 μM) и L-NAME (1 mM). Данные приведены в A₄₅₀ на мкг белка.



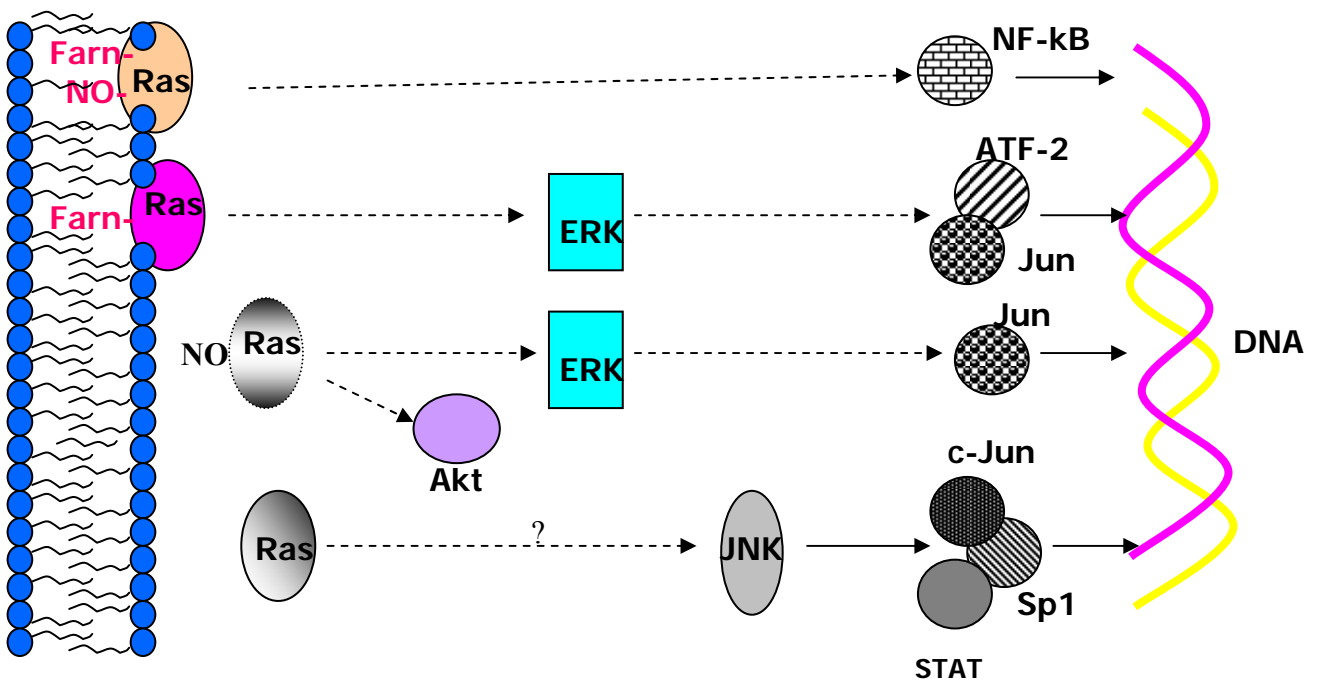
სურათი 11. c-Jun-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A₄₅₀ მკგ ცილაზე.

Рисунок 11. Изменение ДНК-связывающей активности c-Jun фактора в результате 24 часовой инкубации с манумицином (10 μ M) и L-NAME (1 mM). Данные приведены в A₄₅₀ на мкг белка.



სურათი 12. JunD-ფაქტორის დნმ-დაკავშირებული აქტივობის ცვლილება მანუმიცინთან (10 μ M) და L-NAME-სთან (1 mM) 24 საათიანი ინკუბაციის შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A₄₅₀ მკგ ცილაზე.

Рисунок 12. Изменение ДНК-связывающей активности JunD фактора в результате 24 часовой инкубации с манумицином (10 μM) и L-NAME (1 mM). Данные приведены в A_{450} на мкг белка.



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

Схема 1. Влияние нитрозилирования и фарнезилирования на специфичность нисходящих сигнальных путей