

საჯარო სამართლის იურიდიული პირი
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

სეფაშვილი მაია

ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმის როლი ნეიროდეგენერაციული პროცესების
ინიციაციაში

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 საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის ივ. ბერიტაშვილის სახელობის
ფიზიოლოგიის ინსტიტუტში

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: დავით მიქელაძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

ოფიციალური ოპონენტები: თენგიზ სამსონიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

ნანა კოშორიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის _____ საათზე, ბიოფიზიკისა
და მოლეკულური ბიოლოგიის ინსტიტუტის სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე (B. 03-03-N1).

მისამართი: 0160, თბილისი, გოთუას ქ. №12

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია ბიოფიზიკის და მოლეკულური ბიოლოგიის
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. უკანასკნელ წლებში კლინიკურ და თეორიულ მედიცინაში გარკვეულ ინტერესს იწვევს პრობლემები, რომლებიც დაკავშირებულია ნერვული უჯრედების სისტემურ კვდომასთან, რომელსაც ადგილი აქვს ბევრი მწვავე და ქრონიკული ნევროლოგიური დარღვევების დროს. პრაქტიკული და თეორიული მედიცინის ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემას წარმოადგენს ამინომჟავების ტოქსიკურობით გამოწვეული პათოლოგიური პროცესების შესწავლა. ერთ-ერთ ასეთ ამინომჟავას წარმოადგენს ჰომოცისტეინი, რომლის მომატებული დონე შეინიშნება სხვადასხვა დაავადებების დროს. ჰომოცისტეინის დონის მომატება ითვლება გულ-სისხლძარღვთა დაავადებების (ათეროსკლეროზი, თრომბოზი) განვითარების დიდ რისკ-ფაქტორად. გარდა ამისა, უნდა აღინიშნოს, რომ მრავალრიცხოვანმა ეპიდემიოლოგიურმა და ექსპერიმენტულმა შესწავლამ აჩვენა მჭიდრო კავშირი ფოლატის დეპრივაციას, კობალამინის დეფიციტის, ჰომოცისტეინის დონის მომატებასა და მრავალრიცხოვან ნეიროდეგენერაციულ დაავადებს შორის [Mattson, M.P. et. al. 2003].

ჰომოცისტეინი წარმოადგენს გოგირდ-შემცველ არაცილოვან ნეიროტოქსიკურ ამინომჟავას, რომელიც სინთეზირდება მეთიონინიდან და ცენტრალურ ადგილს იკავებს ფოლიუმის მჟავისა და გააქტიურებულ მეთილის ციკლებს შორის. ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმი ორგანიზმში შეიძლება სამი მიმართულებით წარიმართოს: იგი ან გარდაიქმნება მეთიონინად (რემეთილირების გზა), ან ჩაერთვება ცისტეინის სინთეზის ციკლში (რაც უჯრედის ერთ-ერთი ანტიოქსიდანტის, გლუტათიონის სინთეზის საწყისია), ან შეუცვლელად დიფუნდირებს უჯრედგარე სივრცეში. ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმის ეს მესამე გზა უჯრედგარე სითხეებში (პლაზმასა და შარდში) ჰომოცისტეინის საერთო კონცენტრაციის მომატების უშუალო მიზეზად ითვლება [Medina M.A. et. al, 2001].

ჰიპერჰომოცისტეინემია იწვევს ცერებროვასკულარულ დაავადებებს, ინფარქტს, ზოგიერთ ნერვულ და ფსიქიკურ დარღვევას, მათ შორის დეპრესიას, ალცჰაიმერისა და პარკინსონის დაავადებებს. ჰომოცისტეინის დონის მომატების შედეგია სხვადასხვა სახის გართულებები, მაგალითად, ნერვული მილის დეფექტი ორსულებში, გონებრივი აშლილობები, კოგნიტური ფუნქციის დარღვევები მოხუცებში, ფსორიაზი, დემენცია, შიზოფრენია და ზოგიერთი სახის სიმსივნე. ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია, რომ ჰომოცისტეინის მეტაბოლიტი, ჰომოცისტეინის მჟავა ცენტრალური ნერვული სისტემის ნეიროტოქსინს წარმოადგენს და თავის ექსაიტოტოქსიკურ ეფექტს ამჟღავნებს N-მეთილD-ასპარტატის რეცეპტორის სტიმულირების გზით [Ho P.I. et al. 2002]. ჰიპერჰომოცისტეინემიამ შეიძლება გამოიწვიოს დემენცია სხვადასხვა გზით, მაგალითად, ცერებრალური მიკროანგიოგრაფიით, ენდოთელიალური დისფუნქციით და ოქსიდაციური სტრესით, β -ამილოიდ პეპტიდზე დამოკიდებული გაძლიერებული ნეიროტოქსიკურობით და ნერვული აპოფტოზით [Ho, P.I. et al. 2001].

ცნობილია, რომ ჰომოცისტეინის დონის მომატება დაკავშირებულია ოქსიდაციურ სტრესთან, რადგან ეს ამინომჟავა წარმოადგენს უჯრედის მთავარი ანტიოქსიდანტური ნაერთის – გლუტათიონის – წინამორბედს. ოქსიდაციური სტრესის დროს წარმოიქმნება თავისუფალი რადიკალები, რომლებიც ცვლიან უჯრედში მიმდინარე პროცესებს, ჟანგვა-აღდგენით მდგომარეობას და საბოლოოდ იწვევს უჯრედის აპოფტოზს [White B. et al, 2000]. უჯრედში რედოქს-სტატუსის ცვლილების შედეგად გააქტივებული მრავალი რეგულატორული სისტემა აძლიერებს უჯრედის ტრანსკრიფციულ აქტივობას და სტრესზე

პასუხისმგებელი გენების ექსპრესიას (Morel Y. et al, 1999). ამ სისტემებს შორის ყველაზე მნიშვნელოვანია რედოქს-მგრძნობიარე რეგულატორული სისტემა, რომელიც მოიცავს Ras-ცილას, NFκB--სა და cFos ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს. ამ რეგულატორულ სისტემას შეუძლია პრო- ან ანტი-აპოფტოზური გენების ექსპრესიის ინდუცირება (Castagne V. et al, 1999).

Ras ცილები მიეკუთვნებიან ე.წ. პროტონკოცილების ოჯახს, რომლებიც წარმოადგენენ მნიშვნელოვან კომპონენტებს უჯრედშიდა სასიგნალო გზებში და აკონტროლებენ ისეთ პროცესებს, როგორცაა პროლიფერაცია, დიფერენციაცია და უჯრედის პროგრამირებული სიკვდილი [Bredel et al. 1999]. Ras ცილების ფუნქციობის რეგულაცია ხორციელდება GTP-აზური აქტივობის ცვლილებით და პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის გზით, როგორცაა ფარნეზილირება, გერანილგერანილირება, პალმიტირება, მეთილირებას და ა.შ. [Takai Y. et al. 2001].

ლიტერატურაში მოიძებნება მონაცემები ჰომოციტინის მეტაბოლიზმში Ras-ის მონაწილეობის შესახებ [Wang et al, 1992]. მაგრამ მისი მოქმედების ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები უცნობია. რაც მისი ღრმა კვლევის საფუძველს იძლევა.

ჰომოციტინის მეტაბოლიზმის და მასში მონაწილე ნაერთების შესწავლა საშუალებას მოგვცემს დავადგინოთ ჰომოციტინის მეტაბოლიზმის ნორმალური მიმდინარეობის დარღვევით გამოწვეული პათოლოგიური პროცესების ზუსტი მექანიზმები, რაც მნიშვნელოვნად გამოადგება თანამედროვე მედიცინას მოცემული დაავადებების ზუსტი თერაპიული საშუალებების მოძიებაში და შესაძლებელი იქნება ამ პათოლოგიური პროცესების მიზანმიმართული კორექცია მოლეკულურ დონეზე.

კვლევის მიზანი და ამოცანები. კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ჰომოციტინისა და მის მეტაბოლიზმში მონაწილე ნაერთების S-ადენოზილმეთიონინისა და S-ადენოზილჰომოციტინის დონის ცვლილებისა და მასში მიმდინარე პროცესების მოლეკულური მექანიზმების დადგენა.

ზემოაღნიშნული მიზნის შესასრულებლად დასახული იქნა შემდეგი ამოცანები:

- დაგვედგინა ჰომოციტინის მეტაბოლიზმის რეგულაცია ფეოქრომოციტომას PC12 უჯრედულ ხაზებში - M-CR3B-3B და M-M17-26, რომლებიც განსხვავდებიან *ras* გენის ექსპრესიის ხარისხით.
- შეგვესწავლა Ras ცილის ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების გავლენა ჰომოციტინის წარმოქმნაზე ფეოქრომოციტომას PC12 უჯრედულ ხაზებში: M-CR3B-3B და M-M17-26.
- დაგვედგინა კორელაცია ჰომოციტინის დონესა და უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას შორის ფეოქრომოციტომას PC12 უჯრედულ ხაზებში: M-CR3B-3B და M-M17-26.
- დაგვედგინა რედოქს-მგრძნობიარე ტრანსკრიფციული ფაქტორების NF-κB-ს და cFos-ის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილების კორელაცია ჰომოციტინის მეტაბოლიზთან ფეოქრომოციტომას PC12 უჯრედულ ხაზებში: M-CR3B-3B და M-M17-26.
- შეგვესწავლა Ras ცილის ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების გავლენა S-ადენოზილმეთიონინისა და S-ადენოზილჰომოციტინის მეტაბოლიზმზე ფეოქრომოციტომას 3 უჯრედულ ხაზში: M-CR3B-3B, MVR და PC12.

- დაგვედგინა Ras ცილის ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების გავლენა SAM/SAH ფარდობაზე ფეოქრომოციტომას უჯრედულ ხაზებში: M-CR3B-3B, MVR და PC12.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. პირველად იქნა ნაჩვენები, რომ ჰომოციტინის მეტაბოლიზმში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს Ras ცილის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები. პირველად იქნა დადგენილი, რომ ფარნეზილირების დათრგუნვა მანუმიცინით ჰომოციტინის დონის შემცირებას და უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის მომატებას იწვევს, ხოლო ნიტროზილირების დათრგუნვა ზრდის ჰომოციტინის რაოდენობას და ამცირებს სიცოცხლისუნარიანობას. პირველად იქნა დადგენილი კორელაცია Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციებს, ტრანსკრიფციულ აქტივობას, ჰომოციტინის მეტაბოლიზმსა და უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას შორის. პირველად იყო შესწავლილი, რომ Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები ზემოქმედებენ ჰომოციტინის მეტაბოლიზმში მონაწილე ნაერთების კონცენტრაციაზე და მათ თანაფარდობაზე. პირველად იყო დადგენილი, Ras თავის ზემოქმედებას ჰომოციტინის მეტაბოლიზმსა და შესაბამისად უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე ახორციელებს Rac/NADPH ოქსიდაზური სისტემით.

ნაშრომის პრაქტიკული დირექტულება. ჩატარებული კვლევის შედეგები საშუალებას იძლევა დავადგინოთ ჰომოციტინით ინდუცირებული ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიების ეტიოლოგიური საფუძვლები და შევიმუშავოთ შესაბამისი ფარმაკოლოგიური ინტერვენციის სტრატეგია. ნერვულ უჯრედში მეთილის ციკლის, ჰომოციტინის მეტაბოლიზმისა და Ras-ის დადმავალი სასიგნალო გზების რეგულაციის პრინციპები შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას ნეიროდეგენერაციული პროცესების მექანიზმების გასარკვევად.

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

- ნეიროქიმიის საერთაშორისო საზოგადოებისა და ნეიროქიმიის ევროპული საზოგადოების ერთობლივი 20-ე ყრილობა (2005წ, ინსბრუკი, ავსტრია)
- ევროპის ნეირომეცნიერების V ფორუმი (2006 წ., ვენა, ავსტრია)
- აზია-წყნარი ოკეანის ნეიროქიმიის საზოგადოების ყრილობაზე (2006 წ., სინგაპური)
- ევროპის ბიოქიმიკოსთა საზოგადოებების 31-ე კონგრესზე (2006 წ., სტამბული, თურქეთი)
- ი.ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტის ნეიროქიმიისა და ბიოქიმიური ნეიროფარმაკოლოგიის ლაბორატორიების გაერთიანებული სხდომა, რომელიც შედგა 2006 წლის 1 ივნისს.

პუბლიკაციები: დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო სტატია და 6 თეზისი.

დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა. დისერტაცია წარმოდგენილია კომპიუტერზე ნაბეჭდ 101 გვერდზე და მოიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის მასალის და მეთოდების აღწერას, მიღებული შედეგების განხილვას, დასკვნებსა და ბიბლიოგრაფიას (153 წყარო). ნაშრომი ილუსტრირებულია 18 სურათით და ერთი სქემით. ნაშრომი შესრულებულია ქართულ ენაზე.

ექსპერიმენტული ნაწილი

კვლევის ობიექტი: ცდებში გამოყენებული იყო PC12 ფეოქრომოციტომას 4 ხაზი; ველური PC12 უჯრედები, MVR უჯრედული ხაზი - PC12 უჯრედები, რომელშიც ტრანსფექცირებულია დომინანტ- პოზიტიური მუტანტური c-rasH გენი (მე-12 პოზიციამი გლიცინი შეცვლილია ვალინით), MM-CR3B უჯრედული ხაზი-PC-12 უჯრედები, რომელშიც ზეექსპრესირებულია ველური ფორმის c-rasH გენი და M-M17-26 უჯრედული ხაზი - PC-12 უჯრედები, დომინანტ ნეგატიური Ha-Ras-ით. ხაზები მიღებულ და მოწოდებული იქნა პროფესორი ჟ. ზებერენის (პეში, უნგრეთი) მიერ.

უჯრედული კულტურის გაზრდა: PC12, M-CR3B, MVR, M-M17-26 უჯრედები იზრდებოდა DMEM (დულბეკოს მოდიფიცირებული იგლის საკვები არე), რომელიც შეიცავდა 5% ხარის ემბრიონის და 10% ცხენის თერმოინაქტივირებულ შრატს. უჯრედები იზრდებოდა 37⁰-C ტემპერატურაზე, 5%-იანი CO₂ ის პირობებში. აპოფტოზი გამოწვეული იყო კვებითი ფაქტორების ნაკლებობით, რომელიც წარმოიქმნებოდა შრატის მოცილების შედეგად. უჯრედები ირეცხებოდა ინტენსიურად უშრატო საკვები არით და ითესებოდა პოლილიზინით დაფარულ 24 ფოსოიან პლანშეტზე 20x10⁴ უჯრედი/ფოსოზე სიმკვრივით. მეთილის ციკლის მეტაბოლიზმზე Ras-ის ფარნეზილირების და ნიტროზილირების როლის გამოსაკვლევად საკვებ არეში დამატებული იყო L-NAME და მანუმიცინი, შესაბამისად 1 მლმოლი/ლ და 1 მკმოლი/ლ კონცენტრაციებით. მეთილის ციკლის მეტაბოლიტების დონის განსაზღვრა ხდებოდა საკვებ არეში მოცემულ ნაერთებთან 24-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ.

უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა [Miyamoto M. et al,1989]. უჯრედების სხვადასხვა ნაერთთან, მათ შორის, 10⁶მოლ მანუმიცინთან და 1 მმოლ L-NAME ინკუბაციის შემდეგ ვსაზღვრავდით ფერმენტ ლაქტატდეჰიდროგენაზას (LDH) აქტივობას ინკუბაციურ საკვებ არეში და უჯრედების ლიზისის შედეგად მიღებულ სითხეში. აქტივობა ისაზღვრებოდა 65 mM Tris-HCl ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 1 mM პირუვატს, 0.3 mM NADH; 5mM MgCl₂. სპექტროფოტომეტრზე (Jenway 6300) 340nm-ის სიგრძის ტალღაზე იზომებოდა NADH-ის კონცენტრაციის ცვლილება.

უჯრედების ლიზისი მიმდინარეობდა სპეციალურ ლიზისის ბუფერში: 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM PMSF, 1mM დითიოთროლი, 1mM Na₂HPO₄, 1% Triton-X100, 10μg/ml აპროტინინი, 10μg/ml ლეუპეპტინი, 50mM HEPES ბუფერი pH7,5. ლიზისი გრძელდებოდა 30 წუთის განმავლობაში 0°C-ზე. მიღებული ლიზატის დაცენტრიფუგირების (3000 ბრუნვა/წუთში, 20 წუთი 4°C-ზე) შედეგად მიღებულ სუპერნატანტში იზომებოდა LDH აქტივობა ზემოაღწერილი მეთოდით.

უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა ითვლებოდა შემდეგი ფორმულით:

LDH აქტივობა II სუპერნატანტში x 100% = სიცოცხლისუნარიანობა

LDH I სუპერნატანტში + LDH II სუპერნატანტში

ჰომოცისტეინის განსაზღვრა: საკვებ არეში ჰომოცისტეინის დონის განსაზღვრა ხდებოდა Pfeiffer-ის მეთოდით [Pfeiffer at al. 1999] მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფიის საშუალებით (HPLC).

HPLC-ხელსაწყო და ქრომატოგრაფიის პირობები: ცდებში გამოყენებული იყო Waters HPLC სისტემა (Milford, MA, USA). სინჯების დაყოფა ხდებოდა Waters Nova-Pak C18-ის ანალიზურ სვეტში (100 მმ · 83,2 მმ, 5 მკმ ზომის გრანულებით). ფლუორესცენტული დეტექტორით (385 ნმ ექსიტაცია, 515 ნმ ემისია) .

სინჯების დასაყოფად ვიყენებდით, 0,1 M ძმარმჟავის ბუფერს (pH5,5), რომელიც შეიცავდა 3% მეთანოლს, როგორც მობილურ ფაზას, დინების სიჩქარე 0,7 მლ/წთ. სვეტის ტემპერატურა 29°C.

სტანდარტები ჰომოცისტეინი და ცისტეინი იხსნებოდა PBS –ბუფერში pH7, შინაგან სტანდარტს წარმოადგენს ცისტამინი. საბოლოო მოცულობა არის 100 µl, რომელიც შეიცავს 10 µl სტანდარტს. სინჯების ინკუბაცია ხდებოდა ერთი საათის განმავლობაში 60° ტემპერატურაზე,

SAM და SAH ანალიზი: საკვებ არეში SAM და SAH დონის განსაზღვრა ხდებოდა მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფიის საშუალებით (HPLC), როგორც მოხსენებულა ლიტერატურაში (Wang et al. 2001) მცირე მოდიფიკაციებით.

HPLC-ხელსაწყო და ქრომატოგრაფიის პირობები: ცდებში გამოყენებული იყო Waters HPLC სისტემა (Milford, MA, USA). სინჯების დაყოფა ხდებოდა Waters Nova-Pak C18-ის ანალიზურ სვეტში (250 მმ · 4.6 მმ, 5 მკმ ზომის გრანულებით). ინჯექტორსა და ანალიზურ სვეტს შორის ჩაყენებული იყო Waters-ის ის დამცავი წინასვეტი. მობილური ფაზა შედგებოდა ორი ხსნარისაგან: ხსნარი A (8 მმოლი/ლ ოქტანოგირდოვანი მჟავის ნატრიუმის მარილი და 50 mM NaH₂PO₄ ნატრიუმის დიჰიდროფოსფატი, pH 3.0) და ხსნარი B (100%-იანი მეთანოლი). გამოყენებამდე ხსნარი A იფილტრებოდა 0.2 მკმეტრიანი მემბრანის მქონე ფილტრში. HPLC-ის სვეტის გაწონასწორება ხდებოდა 80% A და 20% B ხსნარებით. სინჯების დაყოფა ხდებოდა საფეხურობრივი გრადიენტის გამოყენებით. გრადიენტის პირველი საფეხური გრძელდებოდა 8 წუთი გაწონასწორების პირობებში და შემდგომ 10 წუთის განმავლობაში B ხსნარის კონცენტრაცია აღწევდა 40%-მდე. შემდეგ 3 წუთში კონცენტრაცია უბრუნდებოდა გაწონასწორებულ მდგომარეობას და ასე გრძელდებოდა დაახლოებით 10 წუთის განმავლობაში შემდეგი სინჯის შეყვანამდე. დინების სიჩქარე 1 მლ/წთ. ნაერთების განსაზღვრა ხდებოდა 254 ნმ-ზე. ექსპერიმენტი ოთახის ტემპერატურაზე ტარდებოდა.

SAM და SAH-ის იდენტიფიცირება ხდებოდა იმ რეტენციის (დაყოვნების) დროის შესაბამისად, რომელიც დაფიქსირდა SAH და SAM-ის სტანდარტების თანადროული ქრომატოგრაფიით. რაოდენობრივი შეფასება ეფუძნებოდა პიკის ფარდობის გამოთვლას, ამავე დროს ხდებოდა სტანდარტების (SAM და SAH-ის) საკალიბრაციო მრუდის შედარება. შედეგები გამოსახულია ნანომოლებში 1 მლ არეზე.

სტანდარტები SAH და SAM იხსნებოდა წყალში კონცენტრაციით 0,1 mM და შემდეგ ზავდებოდა 0,4 M HClO₄, იმ საბოლოო კონცენტრაციამდე, რომელიც გამოყენებული იყო HPLC-ის საბოლოო ანალიზისთვის.

სტანდარტული ხსნარების 25 მკლ, რომელიც შეიცავდა 50, 100, 500, 1000 და 5000 პმოლი/სინჯზე, გამოყენებული იყო HPLC-ის ანალიზისთვის.

სინჯების მომზადება: ნაერთებთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედების საკვები არე ამოღებული იყო და მას ემატებოდა HClO₄ საბოლოო კონცენტრაციამდე 0,4 M ცილების

დასაღეჟად. სინჯების შენჯღრევის შემდეგ ხდებოდა 10000g-ზე ცილების დაცენტრიფუგირება 20 წუთის განმავლობაში. მიღებული ნალექზედა სითხე გამოყენებული იყო HPLC-ის ანალიზისთვის.

ტრანსკრიფციის ფაქტორების დონის განსაზღვრა: ბირთვულ ექსტრაქტში ტრანსკრიპციის ფაქტორებს ვსაზღვრავდით BD Mercury TM TransFactor Kit-ის (Clontech-BD Biosciences), როგორც აღწერილია ფირმა-მწარმოებლის ინსტრუქციაში [BD Mercury Protocol].

სუპეროქსიდრადიკალის (ROS) დონის განსაზღვრა: ROS დონე განისაზღვრა ქემილუმინისცენციის მეთოდით. ლუმინოლით გაზრდილი ქემილუმინესცენცია გამოყენებულ იქნა ROS დონის განსასაზღვრად. 5 mM ლუმინოლი გახსნილი (5-ამინო-2,3-დიჰიდრო-1,4-ფტალაზინედიონი) დიმეთილსულფოქსიდში და 1µg/ml პეროქსიდაზა-კონიუგირებული მეორადი ანტისხეულებთან დამატებულ იქნა უჯრედულ ექსტრაქტში (1×10^6 უჯრედები). გაზომვა მიმდინარეობდა სცინცილატორულ მრიცხველზე (LKB, ერთ-ფოტონიანი მონიტორით).

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

III.1 Ras-ცილის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის გავლენა ჰომოციტინის უჯრედშიდა დონეზე M-M17-26 და M-CR3B-Ras ფეოქრომოციტომას უჯრედულ კულტურაში.

ცნობილია, რომ Ras პროტეინი უშუალოდ არის ჩართული შიდაუჯრედული ჟანგვა-აღდგენითი სტატუსის რეგულაციაში. იგი განიცდის მთელ რიგ პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციებს, როგორცაა ფარნეზილირება, მეთილირება, პალმიტირება, ნიტროზილირება, მაგრამ ამ მოდიფიკაციების როლი დაღმავალი ეფექტორების სპეციფიურობაზე შესწავლილი არ არის. Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების ზეგავლენა ჰომოციტინის პროდუქციაზე შევისწავლეთ PC12 ფეოქრომოციტომას შემდეგ უჯრედულ ხაზებში: M-M17-26 უჯრედული ხაზი დომინანტ-ნეგატიური c-ras-H გენით და M-CR3B უჯრედულ ხაზი ზეექსპრესირებული rasH გენით. აღებული იყო 4-4 სინჯი თითოეული ხაზისთვის ცალ-ცალკე: I სინჯი წამოადგენდა სუფთა უჯრედულ კულტურას ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში 24 საათიანი ყოფნის შემდეგ, რომელსაც ვიყენებდით კონტროლისთვის; II სინჯი - უჯრედული კულტურის საკვებ არეში დამატებული იყო 10 მკმოლ მანუმიცინი; III სინჯი - უჯრედული კულტურის საკვები არე შეიცავდა აზოტის ოქსიდის სინთაზის ინჰიბიტორს 1მმოლ L-NAME; IV სინჯი - უჯრედული კულტურის საკვებ არეში დამატებული იყო ორივე ნაერთი _ 1მმოლ L-NAME და 10მკმოლ მანუმიცინი.

უჯრედული კულტურისა და შესაბამისი დანამატების ინკუბაცია გრძელდებოდა 24 საათის განმავლობაში. რის შემდეგაც განისაზღვრა ჰომოციტინის კონცენტრაცია მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფიის (HPLC) მეთოდის გამოყენებით. ჩატარებული

ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ჰომოცისტეინის პროდუქცია მიმდინარეობდა ორივე უჯრედულ ხაზში. M-CR3B-ში ჰომოცისტეინის რაოდენობა მცირდებოდა მანუმიცინის მოქმედებით და იზრდებოდა L-NAME თანაობისას, ხოლო M-CR3B უჯრედულ კულტურაში ორივე ინჰიბიტორის არსებობისას წარმოქმნილი ჰომოცისტეინის დონე უტოლდებოდა საკონტროლოს (სურათი 1). ამრიგად, სავარაუდოდ Ras-ის ფარნეზილირების შედეგად ჰომოცისტეინის რაოდენობა იზრდება, ხოლო Ras-ის ნიტროზილირების დროს მცირდება. არამოდიფიცირებული Ras-ის შემთხვევაში ჰომოცისტეინის დონე არ იცვლებოდა. დომინანტნეგატიური H-ras გენის მქონე M-M17-26 უჯრედულ ხაზში მანუმიცინისა და L-NAME მოქმედება ჰომოცისტეინის პროდუქციაზე საკმაოდ უმნიშვნელოა (სურათი 1), რაც მიუთითებს ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმის რეგულაციაში Ras ცილის მონაწილეობაზე.

იმისათვის რომ, დაგვედგინა კორელაცია ჰომოცისტეინის კონცენტრაციასა და უჯრედული კულტურების უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას შორის Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების ზემოქმედების შედეგად მიმდინარეობდა ზემოხსენებული უჯრედული კულტურების ინკუბაცია მანუმიცინთან და L-NAME-სთან. ფარნეზილტრანსფერაზას და აზოტის ოქსიდის სინთაზას ინჰიბიტორებთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა განისაზღვრა გამოთავისუფლებული ლაქტატდეჰიდროგენაზის რაოდენობის მიხედვით (LDH ტესტი). ჩატარებული კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ მანუმიცინთან და L-NAME-სთან ინკუბაციის შედეგად უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა არ იცვლება M-M17-26 უჯრედულ ხაზში ე.ი. L-NAME და მანუმიცინს არ მოუხდენია აპოფტოზური ეფექტი M-M17-26 უჯრედებზე (სურათი 2). M-CR3B უჯრედული ხაზის შემთხვევაში კი L-NAME მოქმედების შედეგად უჯრედგარე LDH აქტივობა იზრდება (სურათი 2), ე.ი. L-NAME ამცირებს უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას. შესაბამისად, სავარაუდოდ Ras-ის ნიტროზილირების შედეგად იზრდება გადარჩენილი უჯრედების რაოდენობა. უნდა აღინიშნოს, რომ ამ ეფექტს ადგილი აქვს მხოლოდ M-CR3B უჯრედულ ხაზში. ეს მონაცემები მიუთითებს იმაზე, რომ Ras-ის ნიტროზილირება აუცილებელია PC12 ფეოქრომოციტომას უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებისათვის, ხოლო Ras-ის ფარნეზილირება ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში ასტიმულირებს აპოფტოზს.

იმისთვის, რომ დაგვედგინა თუ რომელი დადმავალი გზით ახორციელებს Ras ცილა ჰომოცისტეინის კონცენტრაციის ცვლილების რეგულირებას ჩვენ განვსაზღვრეთ შესაბამისი ტრანსკრიფციული ფაქტორების დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა. ზრდის ფაქტორების დეფიციტის პირობებში გროვდება ჟანგბადის რეაქტიული ფორმები, რომლებიც ახდენენ ზეგავლენას ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმზე, ხოლო Ras და მისი დადმავალი გზები შესაძლოა მნიშვნელოვან როლს თამაშობს შიდაუჯრედული რედოქს-სტატუსის რეგულირებაში. ცნობილია რომ, c-Fos და NFκB ტრანსკრიფციული ფაქტორები რედოქს-მგრძნობიარე ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს წარმოადგენენ, ამიტომ განისაზღვრა მათი დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა.

ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში აზოტის ოქსიდის სინთაზას ინჰიბიტორსა და ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორთან 24 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ M-M17-26 და M-CR3B უჯრედების ბირთვულ ექსტრაქტებში განვსაზღვრეთ c-Fos და NFκB ტრანსკრიფციული ფაქტორების დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობა BD Mercury TM TransFactor Kit-ის გამოყენებით. ჩატარებული ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ M-CR3B-ში მანუმიცინი ზრდის c-Fos-ის (სურათი 3) და ამცირებს NFκB (სურათი 4) აქტივობას, L-NAME

კი ამცირებს ორივე ტრანსკრიფციული ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობას (სურათი 3-4). ზემოხსენებული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ Ras-ის ფარნეზილირება აუცილებელია ამ ტრანსკრიფციული ფაქტორების გააქტივებისთვის. გაირკვა აგრეთვე, რომ NO-ს კონცენტრაციის შემცირება L-NAME-თი ამცირებს $\text{NF}\kappa\text{B}$ -ს აქტივობას, ხოლო ორივე ინჰიბიტორის, მანუმიცინისა და L-NAME-ს არსებობისას $\text{NF}\kappa\text{B}$ -ს აქტივობა ნორმალურ, საკონტროლო დონეს უტოლდება (სურათი 4). M-CR3B უჯრედულ ხაზთან შედარებით M-M17-26 უჯრედებში მანუმიცინით ფარნეზილირების დათრგუნვას არ შეუცვლია არც c-Fos (სურათი 3) და არც NFκB -ს (სურათი 4) აქტივობა. აღნიშნული მონაცემები მიგვითითებენ, რომ Ras-ის ნიტროზილირება და ფარნეზილირება ცვლის ორივე ტრანსკრიფციული ფაქტორის, c-Fos და NFκB, დნმ დამაკავშირებელ აქტივობას, ანუ Ras-ის ფარნეზილირება ამცირებს c-Fos-ის და ზრდის NFκB -ს აქტივობას, Ras-ის ნიტროზილირება კი ზრდის ორივე ტრანსკრიფციული ფაქტორის c-Fos-ის და NFκB -ს აქტივობას.

ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია, რომ ზრდის ფაქტორების დეფიციტის პირობებში არადიფერენცირებულ PC12 ფეოქრომოციტომას უჯრედებში წარმოიქმნება დიდი რაოდენობით ჟანგბადის რეაქტიული ფორმები, რომლებიც ცვლიან უჯრედის ჟანგვა-აღდგენით პოტენციალს და არღვევენ ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმს. ამ მონაცემების გათვალისწინებით Ras შესაძლოა მნიშვნელოვან როლს თამაშობდეს უჯრედშიდა ჟანგვა-აღდგენითი სტატუსის რეგულირებაში Rac/NADPH ოქსიდაციური სისტემის გზით [Li C. et al. 2002. Tammariello S.P. 2000]. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე, ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმსა და ტრანსკრიფციული ფაქტორების აქტივობაზე Ras-ის ფარნეზილირებისა და ნიტროზილირების როლის შესასწავლად გამოყენებულ იქნა მანუმიცინი და L-NAME. Ras-ით გამოხატული სპეციფიკური ეფექტების დემონსტრირებისათვის PC-12 ფეოქრომოციტომას ორი უჯრედული ხაზი დომინანტ-ნეგატიური *ras* გენით (M-M17-26) და (M-CR3B-3B) ტრანსფორმირებული ნორმალური c-rasH იქნა გამოყენებული.

როგორც გაირკვა გამოყენებული კონცენტრაციებით არც მანუმიცინს და არც L-NAME-ს არ გააჩნიათ აპოფტოზური ეფექტი M-M17-26 უჯრედულ კულტურაზე, ხოლო L-NAME ამცირებს M-CR3B უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას. L-NAME მოქმედების შედეგად უჯრედგარე LDH აქტივობა იზრდება მხოლოდ M-CR3B შემთხვევაში. Ras-ის ნიტროზილირება აუცილებელია PC12 ფეოქრომოციტომას უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შენარჩუნებისათვის, ხოლო Ras-ის ფარნეზილირება ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში ასტიმულირებს აპოფტოზს.

ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმზე Ras-პროტოონკოცილის ნიტროზილირების და ფარნეზილირების და მისი ეფექტორული სისტემის ზემოქმედების შესასწავლად განისაზღვრა ჰომოცისტეინის დონე L-NAME-სა და მანუმიცინის მოქმედებით ჩვენს მიერ გამოყენებულ უჯრედულ კულტურებში. აღმოჩნდა, რომ უჯრედების ორივე ტიპში წარმოიქმნება ჰომოცისტეინი და M-CR3B უჯრედებში უფრო მეტი რაოდენობით, ვიდრე M-M17-26 (სურათი 1) უჯრედებში. საინკუბაციო არეში M-CR3B უჯრედებში მანუმიცინის მოქმედების შედეგად ჰომოცისტეინის დონე მნიშვნელოვნად მცირდება და იზრდება L-NAME-ს არსებობისას. M-CR3B უჯრედებში ორივე ინჰიბიტორის თანაობისას კი ჰომოცისტეინის დონე საკონტროლოს უტოლდება. მანუმიცინისა და ML-NAME-ს გავლენა უმნიშვნელოა M M-M17-26 - უჯრედებში.

საინტერესო ურთიერთდამოკიდებულება შეინიშნება M-CR3B ტიპის უჯრედებში ჰომოცისტეინის დონესა და c-Fos აქტივობას შორის, რაც არ აღინიშნება M-M17-26-

უჯრედებში. ეს მონაცემები მიუთითებენ იმაზე, რომ Ras-ის ფარნეზილირება და ნიტროზილირება მოქმედებს ჰომოციტინის მეტაბოლიზმზე, რომლის საბოლოო შედეგს c-Fos-ის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილება წარმოადგენს.

ნეირონების სიკვდილის ერთ-ერთ მიზეზს ხშირად წარმოადგენს ოქსიდაციური სტრესი, რომელიც გამოწვეულია მრავალი ფაქტორით. მაგალითად, ინსულტით, ტრავმებით და ა.შ. მათ შორის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს ზრდის ფაქტორების დეფიციტი [Nicholls D. G. et al. 2000]. ოქსიდაციური სტრესის პასუხში ჩართულია მრავალი რეგულატორული სისიტემა, რომლიდანაც ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესია Ras-პროტონკოცილით რეგულირებადი შიდაუჯრედული სისტემა, რომელიც წარმოადგენს შიდაუჯრედულ რეგულაციაში ცენტრალურ გადამრთველს და პასუხისმგებელია ოქსიდაციური სტრესით გამოწვეული პროცესების რეგულაციაზე. იგი თავის ეფექტს ახორციელებს დაღმავალ ეფექტორულ მოლეკულებზე ზემოქმედებით, რის შედეგად არეგულირებს რამოდენიმე ტრანსკრიფციული ფაქტორის აქტივობას [Santillo M. et al. 2001]. ზრდის ფაქტორების დეფიციტის პირობებში ფეოქრომოციტომას უჯრედების ორი ტრანსფორმირებული ხაზის გამოყენებით, დომინანტ-ნეგატიური და ველური ზეექსპრესირებული Ras-ით გაირკვა, რომ ფარნეზილირების დათრგუნვა და აზოტის ოქსიდის დონის ცვლილება ცვლის c-Fos და NFκB დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობას მხოლოდ Ras ექსპრესირებულ უჯრედებში, მაშინ როცა უჯრედების ხაზში დომინანტ-ნეგატიური Ras-ით ორივე ინჰიბიტორის თანაარსებობისას მნიშვნელოვანი ეფექტი არ შეინიშნება ჰომოციტინის დონის მომატება აღმოჩენილ იქნა ფოლატის დეპრივაციის პირობებში ჰიპოკამპალურ და ემბრიონულ ქერქის ნეირონებში, სადაც მიმდინარეობდა აპოტოზი [Ho P.I. 2003. Kruman T. S. 2002]. ჰომოციტინის დონის მატება ხშირად შერწყმულია ჟანგბადის აქტიური ფორმების ROS წარმოქმნასთან. აქედან გამომდინარე ოქსიდაციური სტრესი შესაძლებელია მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენდეს ჰომოციტინის დაგროვებისათვის. რადგანაც მეთიონინსინთაზა არააქტიურია დაჟანგული ფორმით, ხოლო ცისტათიონ-II-სინთაზა კი აქტიურდება დაჟანგვისას [Danishpajooch I. O. et al 2001, Kruman T. S. 2002] ოქსიდაციურმა სტრესმა შეიძლება გამოიწვიოს რემეთილირების გზის შემცირება და ტრანსსულფირების გაძლიერება, რასაც მივყავართ ჰომოციტინის დონის მომატებამდე. ჩვენი გამოკვლევების შედეგად დადგინდა, რომ L-NAME-ს დამატება იწვევს ჰომოციტინის წარმოქმნის მომატებას, მაშინ როცა მანუმინიცინი ამცირებს M-CR3B ტიპის უჯრედებში ამ ამინომჟავას წარმოქმნას. ეს დაკვირვებები მიუთითებს იმაზე რომ, აზოტის ოქსიდის ფიზიოლოგიური დონე არეგულირებს ჰომოციტინის რესინთეზის მეტაბოლურ გზას, ჟანგვა-აღდგენით სისტემებს აბალანსებს Ras ოპერატიული სისტემის მეშვეობით.

საინტერესო კორელაცია შეინიშნება სეკრეტირებულ ჰომოციტინსა და c-Fos-ის დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობას შორის. c-Fos-ის აქტივობის შემცირება M-CR3B ტიპის უჯრედებში დაკავშირებულია ჰომოციტინის დონის მომატებასთან და პირიქით, c-Fos-ის აქტივობის მომატება კორელირებს ჰომოციტინის წარმოქმნის შემცირებასთან. ჰომოციტინი შესაძლოა იყენებდეს განსაზღვრულ მექანიზმებს სასიგნალო პროცესებზე ზემოქმედებისათვის, რის შედეგადაც ხდება PC-12 უჯრედების გენთა ექსპრესია. როგორც ცილების მეთილირების ინჰიბიტორი, აღმოჩნდა რომ იგი აგრეთვე თრგუნავს ნერვული ზრდის ფაქტორებით გამოწვეულ ნეირიტების ფორმირებას, სავარაუდოდ ამ პროცესს ახორციელებს სასიგნალო ცილების მეთილირების ბლოკირებით [Cimato T. R. et al. 1997]. საპირისპიროდ, ქერქის ნეირონების ჰომოციტინით დამუშავების შედეგად აღმოჩენილია

ტაუ-ცილის ფოსფორილირების გაზრდა ERK გზის მეშვეობით, სასიგნალო გზა, რომელიც Fos ექსპრესიასა და ფოსფორილირებას ასტიმულირებს და Ap-1 აძლიერებს კომპლექსის დაკავშირების აქტივობას [Ho. P. I. et al. 2002]. ჩვენი შედეგები ემთხვევა პირველ დაკვირვებებს: ჰომოცისტეინის დონის მომატება ხელს უშლის PC-12 უჯრედებში c-Fos-ის დნმ-თან დაკავშირებას. სხვა მხრივ, ნაპოვნია დადებითი კორელაცია სეკრეტირებულ ჰომოცისტეინსა და M-CR3B უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას შორის. ასეთი დამოკიდებულება შეინიშნება მხოლოდ ზეექსპრესირებული Ras შემთხვევაში და მაშინ როცა M-M17-26 უჯრედებში ასეთი კორელაცია არაა ნაპოვნი. გარდა ამისა, ჩვენს მიერ ნაჩვენები იყო რომ M-CR3B უჯრედებში მანუმიცინი ზრდის c-Fos-ის აქტივობას. ამრიგად, ამ მონაცემებიდან გამომდინარე ზრდის ფაქტორების დეფიციტის პირობებში Ras გამოწვეული ოქსიდაციური სტრესის შედეგად ჰომოცისტეინი გროვდება და ამ ამინომჟავის კონცენტრაცია თრგუნავს c-Fos-ის დნმ-თან დაკავშირების აქტივობას. მიტოგენური სტიმული მოქმედებს ERK-ზე და ააქტივებს AP-1 კომპლექსს მისი AP-1 კომპონენტის გაძლიერებით [Hu. Q et al. 1995. Kyriakis J. et al. 2001], რადგან ნერვული ზრდის ფაქტორების არარსებობა PC-12 ფეოქრომოციტომას უჯრედებში JNK-ის და p38 ფერმენტის გააქტივებას და ERK-ს დათრგუნვას იწვევს [Xia Z. et al. 1995], აქედან გამომდინარე ჩვენს ექსპერიმენტებში c-Fos-ის აქტივობის დათრგუნვა განაპირობებს Ap-1 სისტემის სუბერთეულების შეუთავსებადობას.

ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად გაირკვა, რომ L-NAME-თი აზოტის ოქსიდის კონცენტრაციის შემცირება აჩქარებს M-CR3B ტიპის უჯრედების აპოფტოზს, მაგრამ ეს ინჰიბიტორი არ ცვლის M-M17-26 ტიპის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას. გარდა ამისა, აღმოჩნდა, რომ L-NAME ამცირებს c-Fos-ის აქტივობას და შესაბამისად ჰომოცისტეინის პროდუქციის გაზრდას იწვევს. რადგან L-NAME-თი აზოტის ოქსიდის სინთაზას ინჰიბირების შემდეგ იცვლება უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა მხოლოდ M-CR3B ტიპის უჯრედებში, შეიძლება დავასკვნათ, რომ აზოტის ოქსიდის შემცირება პირდაპირ მოქმედებს Ras-ზე და ეს ეფექტი არ არის გაშუალებული სხვა რეგულატორული ცილის მაგალითად, c-Fos-ს ნიტროზილირებით [Droge W 2002]. ჩვენი შედეგები ემთხვევა ტენგის-ის მონაცემებს [Teng K. K. 1999], აზოტის ოქსიდით c-Ha-Ras-ის გააქტივება PC-12 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ცვლის და იცავს მათ აპოფტოზისაგან.

მანუმიცინის მოქმედების შედეგად M-CR3B უჯრედებში NFκB -ს აქტივობა მცირდება, რაც იმის მანიშნებელია, რომ Ras-ის ფარნეზილირება აუცილებელია ამ ტრანსკრიფციული ფაქტორის გააქტივებისთვის. გაირკვა, რომ NO-ს კონცენტრაციის შემცირება L-NAME-თი ამცირებს NFκB -ს აქტივობას, მაგრამ პარადოქსია, რომ ორივე ინჰიბიტორის, მანუმიცინისა და L-NAME-ს, არსებობისას NFκB -ს აქტივობა ნორმალურ, საკონტროლო დონეს უტოლდება. ეს მონაცემები მიგვითებს იმაზე, რომ ორივე, არაფარნეზილირებული და არანიტროზილირებული Ras მოქმედებს იმავე დადამავალ ეფექტორებზე, რომლებზეც ორმაგად მოდიფიცირებული Ras. ჩვენი მონაცემები ემთხვევა ბერგოს მონაცემებს [Bergo M. O. 2004], CAAX ცილების კარბოქსილის ჯგუფების მეთილირებას გავლენა აქვს Ras -ზე, ხოლო სუსტ ან არანაირ ზეგავლენას არ ახდენს დადამავალი ეფექტორების სპეციფიურობაზე.

ფარნეზილირებული Ras სპეციალური CAAX პროტეაზებით განიცდის მოდიფიცირებას, რის შემდეგაც იგი ჩაშენდება პლაზმურ მემბრანაში, სადაც მიმდინარეობს ამ ცილის მრავალრიცხოვანი ცისტეინის ნაშთების პალმიტირება. აქედან გამომდინარე, Ras-ის ტერმინალური ცისტეინის S-ნიტროზილირება მნიშვნელოვანია, რადგან ხელს უშლის Ras-ის მემბრანაში ჩაშენებას.

ამრიგად, ექსპერიმენტების შედეგად მიღებული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ზრდის ფაქტორების დეფიციტის პირობებში ხდება Ras ცილის (სავარაუდოდ Ha-ras) გააქტივება, რომელიც Rac/NADPH ოქსიდაციური სისტემის მეშვეობით იწვევს პერმანენტულ ოქსიდაციურ სტრესს. ოქსიდაციური სტრესის შედეგად გროვდება ჟანგბადის აქტიური ფორმები. ასეთი სახის რადიკალები განაპირობებენ მეთიონინსინთაზას ინჰიბირებას და ჰომოცისტეინის დაგროვებას, რომელიც საბოლოოდ უჯრედების აპოფტოზს აჩქარებს.

III.2 Ras-ცილის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციის გავლენა S-ადენოზილმეთიონინისა და S-ადენოზილჰომოცისტეინის პროდუქციაზე და მათ უჯრედშიდა თანაფარდობაზე V12-H-Ras და M-CR3B-Ras ფეოქრომოციტომას უჯრედულ ხაზებში.

Ras-ის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების ზეგავლენა მეთილის ციკლის ნაერთებზე S-ადენოზილმეთიონინისა და S-ადენოზილჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმზე შევისწავლეთ შემდეგი სახის უჯრედულ ხაზებში: PC12 ფეოქრომოციტომას უჯრედულ ხაზის უჯრედები ველური *ras* გენით, უჯრედული ხაზი მუტანტური ონკოგენური *rasH* გენით (MVR) და M-CR3B უჯრედულ ხაზი ზეექსპრესირებული *rasH* გენით. [Szeberenyi et al.,1990]. მეთილის ციკლის მეტაბოლიზმზე Ras-ის ნიტროზილირების და ფარნეზილირების როლის გამოკვლევისთვის გამოყენებულ იქნა L-NAME და მანუმიცინი, აზოტის ოქსიდის სინთაზას და ფარნეზილირების ინჰიბიტორები შესაბამისად. აღებული იყო სინჯები თითოეული ხაზისთვის ცალცალკე: I სინჯი შეიცავდა სუფთა უჯრედულ კულტურას, რომელსაც ვიყენებდით კონტროლისთვის; II სინჯი - უჯრედულ კულტურაში დამატებული იყო მანუმიცინი; III სინჯი-უჯრედული კულტურა შეიცავდა L-NAME; IV სინჯი - უჯრედული კულტურა შეიცავდა L-NAME და მანუმიცინს. უჯრედული კულტურის L-NAME-სთან და მანუმიცინთან ინკუბაცია გრძელდებოდა 24 საათი, რის შემდეგ უჯრედულ კულტურებში განისაზღვრა S-ადენოზილმეთიონინისა და S-ადენოზილჰომოცისტეინის კონცენტრაცია მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფიის (HPLC) მეთოდის გამოყენებით. ჩატარებული კვლევების ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ L-NAME-ს მოქმედებით მეთილის ციკლის ერთ-ერთი მეტაბოლიტის, SAM-ის დონე იზრდება PC-12 და M-CR3B უჯრედებში, MVR უჯრედებში კი მისი პროდუქცია მნიშვნელოვნად არის დაქვეითებული (სურათი 9). რაც მიუთითებს იმაზე, რომ Ras-ის ნიტროზილირების შედეგად SAM-ის რაოდენობა მცირდება, ხოლო MVR-ში მიღებული საპირისპირო ეფექტი მიუთითებს ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმში Ras პროტეოზოციტომის მონაწილეობაზე.

ფარნეზილირების ინჰიბიტორის, მანუმიცინის მოქმედებისას კი საპირისპირო ეფექტი მიიღება, ანუ S-ადენოზილმეთიონინის რაოდენობა შემცირებულია M-CR3B უჯრედულ კულტურაში, MVR უჯრედებში მომატებულია, ხოლო PC-12 უჯრედებში სურათი ამ შემთხვევაშიც არ იცვლება (ცხრილი 1). ეს შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ Ras-ის ფარნეზილირება იწვევს მეთილის ციკლის მეტაბოლიტის SAM-ის დონის გაზრდას M-CR3B უჯრედებში, ხოლო MVR-ში ადგილი აქვს საპირისპირო ეფექტს.

ფარნეზილირებისა და ნიტროზილირების ინჰიბიტორების თანადროული ზემოქმედების დროს SAM რაოდენობა იზრდება PC12 და უფრო შესამჩნევად M-CR3B უჯრედებში, MVR უჯრედებში კი მცირდება (ცხრილი 1), რაც ადასტურებს Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენას SAM-ის დონეზე.

შესაბამისად, მეთილის ციკლის მეორე მეტაბოლიტის SAH დონე განვსაზღვრეთ PC12, M-CR3B და MVR უჯრედებში მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიის მეთოდის (HPLC) გამოყენებით. ჩატარებული ექსპერიმენტების ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ M-CR3B უჯრედებში L-NAME ზემოქმედებისას SAH დაგროვება კლებულობს, მაშინ როდესაც SAH პროდუქცია MVR უჯრედებში ძლიერ მატულობს (ცხრილი 1). ამ საპირისპირო ცვლილებებმა გვაჩვენა, რომ MVR უჯრედები განსხვავდება M-CR3B უჯრედული ხაზისგან აზოტის ოქსიდის მუდმივი დონის მიმართ მგრძობელობაში, რომელიც აშკარად ზემოქმედებს ონკოგენურ და ნორმალურ Ras-ზე გარკვეული გზებით.

რაც შეეხება მანუმიცინის გავლენას SAH-ის დონეზე M-CR3B უჯრედებში მანუმიცინი დამუშავებისას SAH რაოდენობა იზრდება PC12, M-CR3B და MVR უჯრედებში (ცხრილი 1), რაც მიუთითებს იმაზე, რომ Ras-ის ფარნეზილირება ამცირებს მეთილის ციკლის მეტაბოლიტის SAH-ის დონეს ფოქრომოციტომას სამივე ტიპის უჯრედულ ხაზში.

S-ადენოზილჰომოციტეინის დონეზე ფარნეზილირებისა და ნიტროზილირების ინჰიბირების თანადროულმა გავლენამ აჩვენა, რომ M-CR3B უჯრედულ ხაზში მნიშვნელოვნადაა შემცირებული SAH დონე, ხოლო MVR-ში მომატებული, PC-12-ში კი უმნიშვნელოდაა გაზრდილი (ცხრილი 1). რაც მიუთითებს იმაზე, რომ არამოდიფიცირებული Ras-ის შემთხვევაში ადგილი აქვს SAH-ის რაოდენობის შემცირებას და შესაბამისად მეთილირების პროცესების გაზრდას M-CR3B უჯრედულ ხაზში, ხოლო ონკოგენური Ras-ის მქონე უჯრედებში საპირისპირო ეფექტი შეიმჩნევა. რაც კიდევ ერთხელ ადასტურებს იმას, რომ ონკოგენური Ras სრულიად განსხვავებული სასიგნალო გზების ჩართვას უზრუნველყოფს და შესაბამისად საპირისპირო ეფექტები მიიღება.

ზემომოცემული შედეგების მიხედვით ნათელი ხდება, რომ ჰომოციტეინის მეტაბოლიზმის დასახასიათებლად მნიშვნელოვანია მეთილის ციკლის მეტაბოლიტების SAM და SAH დონის შესწავლა. შესაბამისად მათი თანაფარდობის, SAM/SAH თანაფარდობა, მაჩვენებელი ჰომოციტეინის მეტაბოლიზმის ერთ-ერთ ძირითად მახასიათებლად შეიძლება ჩაითვალოს. ამის გათვალისწინებით ჩვენ განვსაზღვრეთ SAM/SAH თანაფარდობა M-CR3B, MVR და PC-12 უჯრედებში Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების ნიტროზილირებისა და ფარნეზილირების ინჰიბიტორების გავლენის შედეგად. ჩატარებული ანალიზის Aშედეგად დადგინდა, რომ L-NAME მნიშვნელოვნად ცვლის SAM/SAH ფარდობას M-CR3B და MVR უჯრედებში. M-CR3B უჯრედებში L-NAME ზემოქმედებისას SAM/SAH ფარდობა მომატებულია, მაშინ როდესაც MVR უჯრედებში ეს ფარდობა შემცირებულია. ფარნეზილირების ინჰიბიტორის მანუმიცინის ზემოქმედებისას SAM/SAH თანაფარდობა მნიშვნელოვნად მცირდება M-CR3B უჯრედებში (ცხრილი 1), ხოლო MVR-ში ცვლილება უმნიშვნელოა. ფარნეზილტრანსფერაზისა და აზოტის ოქსიდის სინთაზის ინჰიბიტორების მანუმიცინისა და L-NAME თანადროული დამუშავებისას SAM/SAH თანაფარდობა მნიშვნელოვნად მცირდება M-CR3B უჯრედებში, ხოლო MVR-ში ცვლილება უმნიშვნელოა (ცხრილი 1).

რადგან ოქსიდაციური სტრესის პირობებში ირთვება სრულიად სპეციფიკური პროცესები, აქედან გამომდინარე დაისახა მიზნად გაგვესაზრვრა Ras-ით გაშუალებული ROS-

ის პროდუქცია, რისთვისაც გამოვიყენეთ PC12, M-CR3B და MVR უჯრედები, რომელშიც განისაზღვრა თავისუფალი რადიკალები ქემილუმინისცენციის მეთოდით. აღმოჩნდა, რომ M-CR3B და MVR უჯრედებში გროვდება მეტი ROS ვიდრე PC12-ში, ხოლო უჯრედების L-NAME-თი დამუშავების შემდეგ ROS-ის პროდუქციის მნიშვნელოვანი დათრგუნვა შეიმჩნევა მხოლოდ M-CR3B უჯრედებში. თუ გავითვალისწინებთ, რომ ROS-ის რაოდენობის ცვლილება კორელირებს SAM და SAH-ის ბიოსინთეზთან, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ შიდაუჯრედული სუპეროქსიდრადიკალები ჩართულია მეთილის ციკლის რეგულირებაში (სურათი 6)

S-ადენოზილმეთიონინი წარმოადგენს მეთილის ჯგუფის ძირითად დონორს და 300 მდე მეთილტრანსფერაზას შეუძლია მოიხმაროს ეს ნაერთი ფოსფოლიპიდების, ნუკლეინის მჟავების, ნეიროგადამცემების და ცილების მეთილირებისთვის [Katz, J.E.,2003]. SAM/SAH ფარდობის შემცირება ნეგატიურად ზემოქმედებს დნმ-ის მეტაბოლიზმზე, ცვლის მეთილტრანსფერაზების აქტიურობას, რაც განაპირობებს მომატებული მიტოზური რეკომბინაციების გზით სიმსივნური უჯრედების გენომურ არასტაბილურობას. გენომური მეთილირების დაქვეითება წარმოადგენს ხშირ და ადრეულ მოვლენას სიმსივნური პროცესის დროს და კორელირებს მრავალი ტიპის სიმსივნეში დაავადების სიმძიმესთან და მეტასტაზურ პოტენციალთან. ფოლატი/მეთიონინის ნაკლებობა იწვევს კანცეროგენეზს, რომელსაც თან ახლავს SAM-ის ქმედითუნარიანობის შემცირება, და მიუხედავად დნმ-მეთილტრანსფერაზული აქტივობის მომატებისა იწვევს გენომის ჰიპომეთილირებას [James JS, 2003]. მას შემდეგ რაც ონკოგენური Ras ზრდის დნმ-მეთილტრანსფერაზულ აქტიურობას [MacLeod AR, 1995] და იწვევს ინტენსიურ ოქსიდაციურ სტრესს [Cho H-J, 2002], შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ მეთიონინსინთაზას ჟანგვითი ინჰიბირება, რომელსაც თან ახლავს ტრანსულფირების გზის გააქტივება და SAM-ის რესინთეზის დაქვეითება, შესაძლოა აბერანტული დნმ-ის სინთეზს და ნეოპლაზმურ გადაგვარებას ასტიმულირებდეს.

დადგინდა, რომ L-NAME მნიშვნელოვნად ცვლის SAM/SAH ფარდობას M-CR3B და MVR უჯრედებში. ეს ცვლილება მეთილის ციკლში ატარებს რეციპროკულ ხასიათს, M-CR3B უჯრედებში L-NAME ზემოქმედებისას SAM/SAH ფარდობა მომატებულია, მაშინ როდესაც MVR უჯრედებში ეს ფარდობა შემცირებულია (ცხრილი 1). ჩანს, რომ ეს ცვლილებები წარმოადგენს ორი ფერმენტის აქტიურობის ცვლილების შედეგს: ცისტათიონინ- β -სინთაზა, რომელიც აკატაბოლიზებს ჰომოცისტეინის გარდაქმნას ცისტათიონად (ტრანსსულფირების გზა) და შემდეგ გლუტათიონად, და მეთიონინსინთაზა, რომელიც გარდაქმნის ჰომოცისტეინს მეთიონინად (რემეთილირების გზა). როცა SAM/SAH შიდაუჯრედული ფარდობა მიგვანიშნებს ტრანსმეთილირების დონეს, შეიძლება ვივარაუდოთ რომ L-NAME აქვეითებს რემეთილბას MVR უჯრედებში, ხოლო M-CR3B უჯრედებში ზრდის SAM რესინთეზის დონეს. თუ გავითვალისწინებთ, რომ მეთიონინსინთაზა ინაქტივირდება დაჟანგვისას და რეაქტიულობისთვის აღდგენით მეთილირებას საჭიროებს [Danishpajoo IO, 2001], ხოლო რკინის შემცველი ცილა ცისტათიონინ β -სინთაზა აქტიურია დაჟანგული ფორმით [Taoka S., 1998], შეიძლება ვიფიქროთ, რომ MVR უჯრედებში რემეთილირების დაქვეითება სავარაუდოდ მომატებული ოქსიდაციური სტრესით არის განპირობებული. ამრიგად, ონკოგენური Ras, ველური ტიპის Ras-ისგან განსხვავებით, იწვევს უფრო ძლიერ ოქსიდაციურ სტრესს. H-Ras V12 არის ტრანსფორმაციის ძალიან ძლიერი გამომწვევი და Ras ონკოგენური პოტენციალი კორელაციაშია PI3K /Akt/Rac/ROS გზასთან NIH3T3 უჯრედებში [Sheng et al., 2001, Cho et al., 2002].

Ras/Rac1/NADPH ოქსიდაზური გზა შუამავლობს ROS პროდუქციას ონკოგენური H-Ras-ით და არსებობს პირდაპირი კავშირი Ras/PI3K/Rac1/NADPH ოქსიდაზური გზის აქტივაციასა და NIH3T3 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას შორის. Ras ტრანსფორმირებული უჯრედები წარმოქმნის შიდაუჯრედულ ROS NIH3T3 უჯრედებში [Irani et al., 1997], ადამიანის კერატინოციტურ HaCaT უჯრედებში [Yang et al., 1999], და ადამიანის ფილტვის WI-38VA-13 უჯრედებში [Liu et al., 2001]. ROS-ის ეს პროდუქცია მიმდინარეობს არაფაგოციტური უჯრედების მემბრანაში ლოკალიზებული მრავალნაწილიანი ფერმენტის - NADPH ოქსიდაზას Rac-დამოკიდებული აქტივაციის შუამავლობით. არსებობს მზარდი მონაცემები, რომ ROS-ის პროდუქციის მცირედროული მომატება ფუნქციურად არის დაკავშირებული გენების ექსპრესიის რეგულაციასთან და ტრანსკრიფციის ფაქტორებთან, როგორცაა NF- κ B, AP-1 და Sp1 [Thannickal et al., 2000; Ishii et al., 2000]. თუმცა, ROS ის როლი ონკოგენური სიგნალის ტრანსდუქციაში უცნობი რჩება.

MVR და M-CR3B უჯრედებზე L-NAME-ის საპირისპირო ეფექტები არ არის სრულად გასაგები. ნაჩვენებია, რომ აზოტის ოქსიდის დონორ ნაერთებს შეუძლია ასტიმულიროს PC12 უჯრედებში Ha-Ras-ზე პალმიტინის ცვლა და, რომ ამ სტიმულირებისთვის მექანიზმი შესაძლოა იყოს ძირითადი პალმიტინის მოცილების დაჩქარების გზა [Baker T.L., 2000]. ამრიგად, ენდოგენურ NO-ს შეუძლია დაარეგულიროს მეთილის ციკლი რკინის ნაკადითა და ცისტათიონინ- β -სინთაზას აქტიურობით. როგორც მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა L-NAME-თი ენდოგენური NO-ს გამოლევა ამცირებს SAM/SAH ფარდობას მხოლოდ დომინანტ-პოზიტიურ V12-H-Ras PC12 უჯრედებში (ცხრილი 1). შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ აზოტის ოქსიდის მუდმივი დონის დაქვეითებას შეუძლია შეცვალოს მეთილის ციკლი ROS-ის პროდუქციის გაზრდით, რომელსაც ონკოგენური Ras წარმართავს.

ეს შედეგები მიგვანიშნებს, რომ Ras-ის აცილირებული, მემბრანასთან ბმული COOH ტერმინალური უბანი განსხვავდება უჯრედული H-Ras-გან და რომ H-Ras-ის ონკოგენურ ფორმებში გვხვდება სტრუქტურული ცვლილებები COOH-ტერმინალურ დომენში. იმ შემთხვევაში როცა Ras-ის C-ტერმინალური დომენი მონაწილეობს ტრანსფორმაციაში [Maher et al., 1995] და H-Ras-ის C-ტერმინალური ცისტეინის ნაშთი არის ნიტროზილირების ძირითადი სამიზნე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ L-NAME-თი აზოტის ოქსიდის მუდმივი დონის დაქვეითებას შეუძლია გაზარდოს პალმიტინის ბრუნვა, გააძლიეროს Ras-ის ონკოგენური პოტენციალი, რომელიც მოიცავს ROS-ის პროდუქციას.

თანამედროვე კვლევები გვაჩვენებენ, რომ უჯრედშიდა NO-ს გამოლევა ზრდის რკინის ჰომეოსტაზს და მიგვანიშნებს საპირისპირო ურთიერთკავშირზე ენდოგენურ NO-სა და უჯრედულ რკინის დონეს შორის [Matsunaga et al., 2004]. NO ახდენს ცერამიდის პროოქსიდანტური და პროაპოფტოზური ეფექტების სუპრესიას შიდაუჯრედული რკინის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებით და საპირისპირო ურთიერთკავშირზე ენდოგენურ NO-სა და უჯრედულ რკინის იონებს შორის მიგვითითებს. ცერამიდით გამოწვეული ოქსიდაციური სტრესი სავარაუდოთ გამოწვეულია Rac 1-ის გააქტივებით [Desphande et al., 2003], რომელიც NADPH ოქსიდაზა/ROS გზით არეგულირებს Ras-გამშალებული უჯრედული ეფექტების უმრავლესობას, მათ შორის ტრანსფორმაციას [Irani et al., 1997; Yang et al., 1999]. ამრიგად, ენდოგენურ NO-ს შეუძლია დაარეგულიროს მეთილის ციკლი რკინის ნაკადითა და ცისტათიონინ β -სინთაზას აქტიურობით. აღსანიშნავია, რომ ცისტათიონინ β -სინთაზას მავალირებელი გენის პრომოტორი 1b რეგულირდება რედოქს-მგრძნობელობაზე მოქმედებისას Sp1 და NF- κ B და Sp1 და Sp3 შორის სინერგისტული ურთიერთქმედების

საშუალებით [Wilson E. M. et al. 2004]. Sp1-ანალოგი ცილები ძლიერ არის დაკავშირებული რედოქს-მგრძობიარე თუთიათითისებურ ცილებთან, რომელიც არის ეუკარიოტული უჯრედის ტრანსკრიფციული მექანიზმის მნიშვნელოვანი შემადგენელი ნაწილი.

რადგანაც, L-NAME-თი ენდოგენური NO-ს გამოლევა ამცირებს SAM/SAH ფარდობას მხოლოდ დომინანტ პოზიტიურ V12-H-Ras PC12 უჯრედებში, შეიძლება ვივარაუდოთ რომ აზოტის ოქსიდის მუდმივი დონის დაქვეითებას შეუძლია შეცვალოს მეთილის ციკლი ROS-ის პროდუქციის გაზრდით, რომელსაც ონკოგენური Ras წარმართავს. ოქსიდაციურ სტრესს, პირდაპირ ან რედოქს-მგრძობიარე ტრანსკრიფციული ფაქტორებით, შეუძლია შეცვალოს ცისტათიონინ β -სინთაზასა და მეთიონინსინთაზას აქტიურობა, რაც გადართავს მეთილის ციკლის გზებს რემეთილირებიდან ტრანსულფირებისკენ, რათა ადაპტაციური პროცესის საშუალებით შეინარჩუნოს შიდაუჯრედული გლუტათიონის მარაგი, რაც აუცილებელია უჯრედების რედოქსრეგულირებადი სიცოცხლისუნარიანობისთვის.

დასკვნები

1. ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში ჰომოცისტეინის დონის ცვლილებაზე მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენენ Ras პროტონკოპროტეინის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები, კერძოდ ფარნეზილირებული Ras ცილა ზრდის ჰომოცისტეინის დონეს, ხოლო ნიტროზილირებული ამცირებს მის პროდუქციას;
2. Ras პროტონკოცილის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები ჰომოცისტეინის დონის რეგულირების გზით მოქმედებენ ნერვული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე, კერძოდ ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში Ras-ის ფარნეზილირება ასტიმულირებს აპოფტოზს, ხოლო Ras-ის ნიტროზილირება აუცილებელია ფეოქრომოციტომას PC12 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შესანარჩუნებლად;
3. ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში Ras ცილა თავის ეფექტს ახორციელებს ტრანსკრიფციული ფაქტორების დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილებით, ანუ Ras-ის ნიტროზილირება და ფარნეზილირება მოქმედებს ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმზე, რომლის საბოლოო შედეგს c-Fos-ის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილება წარმოადგენს;
4. ფარნეზილირებული, მემბრანაში არსებული Ras-ის გააქტივება იწვევს SAM-ის დონის მატებას, ამცირებს SAH-ის დონეს, რის შედეგადაც იზრდება SAM/SAH-ის შეფარდება. ნიტროზილირებული Ras-ის გააქტივება იწვევს SAM-ის დონის დაკლებას, ზრდის SAH-ის დონეს, რის შედეგადაც მცირდება SAM/SAH-ის შეფარდება.
5. *ras* ონკოგენის მქონე უჯრედებში Ras-ის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენა საპირისპირო ხასიათს ატარებს. კვებითი ფაქტორების არარსებობის პირობებში აზოტის ოქსიდის მუდმივი დონის შემცირება ასტიმულირებს Ras-პროტონკოცილის მემბრანასთან დაკავშირებას, რომელიც შესაბამისად Rac/NADPH ოქსიდაზური სისტემით იწვევს პერმანენტულ ოქსიდაციურ სტრესს და გადართავს მეთილის ციკლის გზებს რემეთილირებიდან ტრანსულფირებისკენ.

6. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ნერვულ უჯრედებში Ras-ცილის გავლენა ჰომოცისტეინის მეტაბოლიზმი რეგულირდება მისი პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციებით, რომლებიც ცვლიან ტრანსკრიფციული ფაქტორების დნმ-დამაკავშირებელ აქტივობას. კერძოდ ფარნეზილირების შემთხვევაში c-Fos აქტივობა მცირდება და ჰომოცისტეინი ძირითადად მეთილის ციკლში ჩაერთვება, ხოლო ნიტროზილირების დროს c-Fos-ის აქტივობა იზრდება და აქტივდება ტრანსულფირების გზა, რის შედეგად აღდგება გლუტათიონის რეზერვი, რაც ოქსიდაციური სტრესის პირობებში უჯრედების აპოფტოზისგან გადარჩენის კომპენსაციურ მექანიზმს წარმოადგენს.

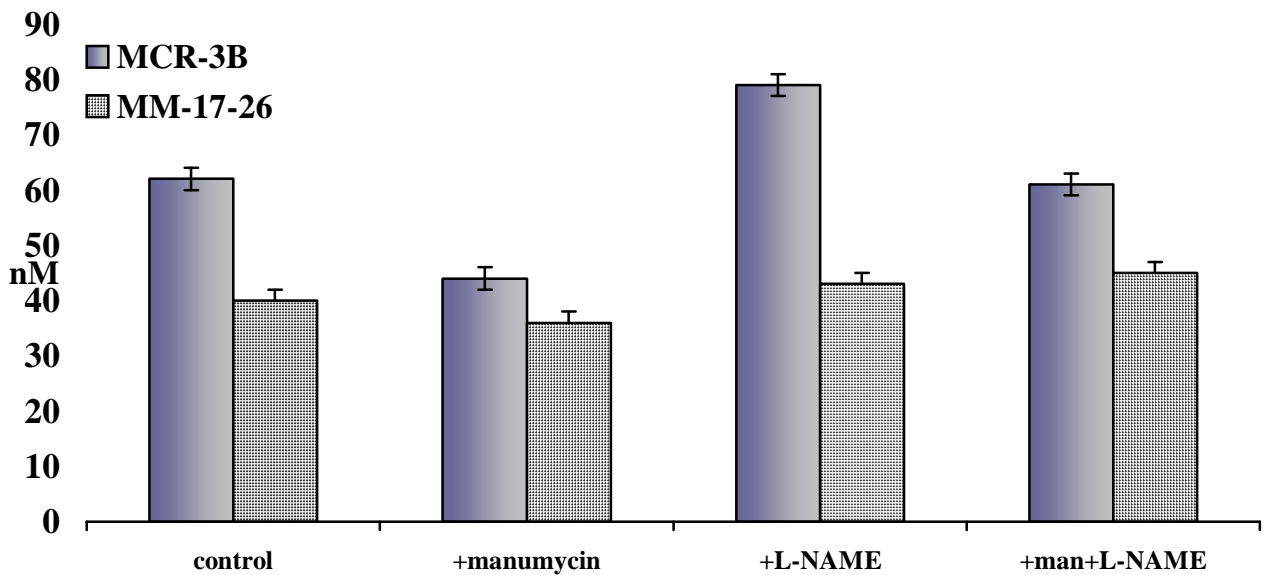
დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომები:

1. Sepashvili M., Zaalishvili E., Zhuravliova E., Barbakadze T., Mikeladze D. **Modifications of Ras alter content of secreted homocysteine by PC-12 cells.** *Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. A*, 2005, vol. 31, No. 2. 247-253.
2. Barbakadze T., E. Zhuravliova, M. Sepashvili, E. Zaalishvili, J.J. Ramsden, J. Bátor, J. Szeberényi and D. Mikeladze. **Production of homocysteine in serum-starved apoptotic PC12 cells depends on the activation and modification of Ras.** *Neuroscience Letters* 2005, vol. 391, issue 1-2, 56-61.
3. Sepashvili M., Zhuravliova E., Barbakadze T., Khundadze M. and Mikeladze **Oncogenic H-Ras enhances production of S-adenosylhomocysteine and reduces the level of S-adenosylmethionine in PC12 cells.** *Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. A*, 2006, vol.32.829-834
4. Zhuravliova E., Barbakadze T., M. Sepashvili, E. Zaalishvili and D. Mikeladze **Production of homocysteine in the withdrawal conditions depends on the activation and modification of Ras in apoptotic PC12 cells.** *20-th Biennial Meeting of ISN and ESN, Innsbruck, Austria 2005, Abstracts. Journal of Neurochemistry*
5. 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: A202.16mistry, 2005, vol 94, p. 177*
6. Sepashvili M., Zhuravliova E, Barbakadze T., . Narmania N., and Mikeladze D.G. **modifications of Ras alter content of secreted homocysteine by PC12 cells.** *31st FEBS Congress, FEBS Journal, 2006, 273(s1): 110*
7. Zhuravliova E., Sepashvili M., Narmania N. Barbakadze T., and Mikeladze DG. **The neuroprotective effect of insulin involves activation of membrane-bound Ras and downstream antiapoptotic pathway through the association of GRF-SOS adaptor protein.** *Journal of Neurochemistry* 2006, **98** (s1), 98-101

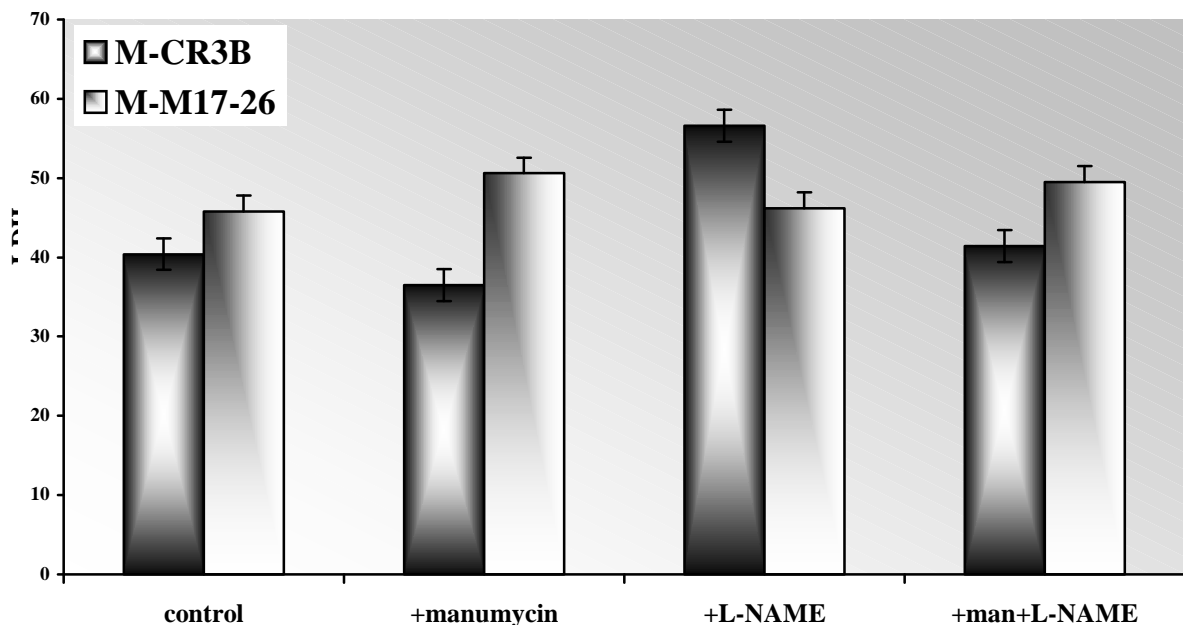
8. Barbakadze T., Zhuravliova E., Sepashvili M., Narmania N. and Mikeladze D.G. **Farnesylation and nitrosylation change the intrinsic GTP-ase activity of p21^{Ras}.** *5th Forum of European Neuroscience, Vienna, July 8-12, 2006. Abstract Book 512: A222.5.*

9. Barbakadze T., Zhuravliova E., Sepashvili M., Narmania N. and Mikeladze DG. **Farnesylation and nitrosylation change the intrinsic GTP-ase activity of p21^{Ras}.** *Journal of Neurochem. 2006,98 (s1), 121-126.*

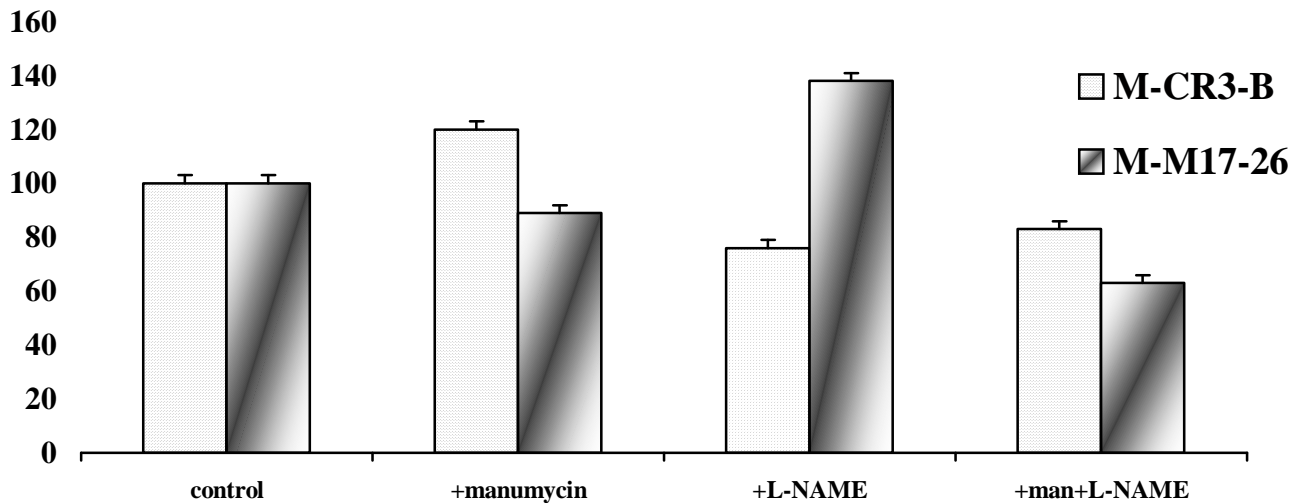
სურათი



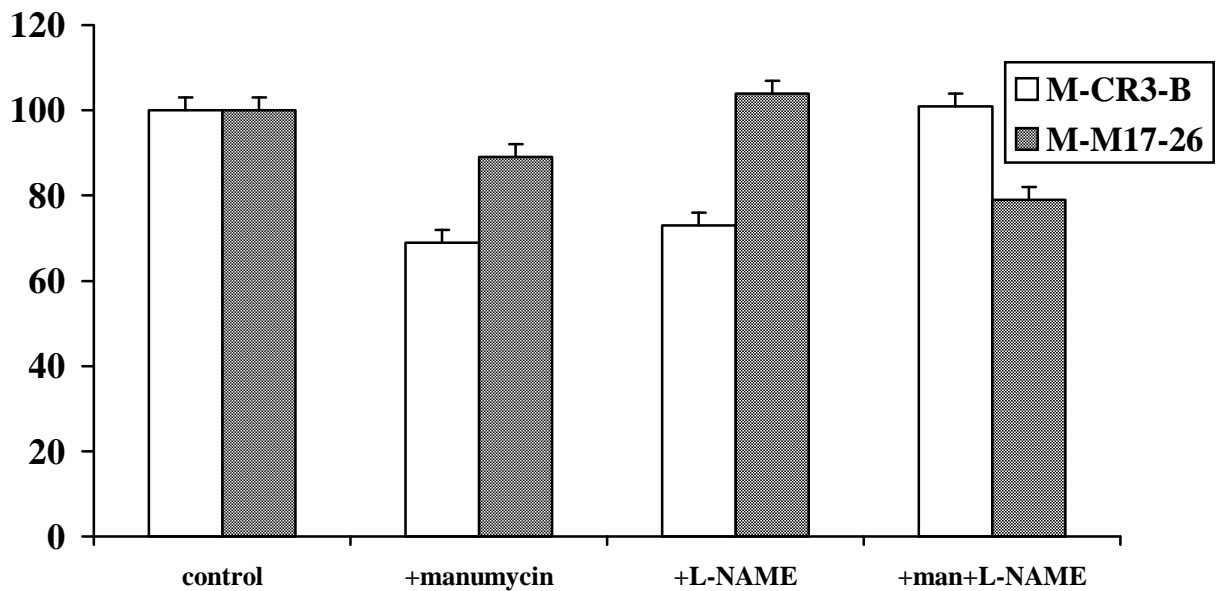
სურათი 1. ჰომოცისტეინის პროდუქცია M-CR3B-3B და M-M17-26 უჯრედებში L-NAME (1mM) და მანუმიცინით (10μM) დამუშავების შედეგად (HPLC ანალიზი).



სურათი 2. მანუმეცინის (10 μ M) და L-NAME (1mM) ეფექტი MM17-26 და M-CR3B-3B უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე (LDH ტესტი). კონტროლად მიჩნეული იყო 24 საათიანი ტროფული ფაქტორების დეფიციტის პირობებში მყოფი კულტურის ლაქტატდეჰიდროგენაზური აქტივობა.



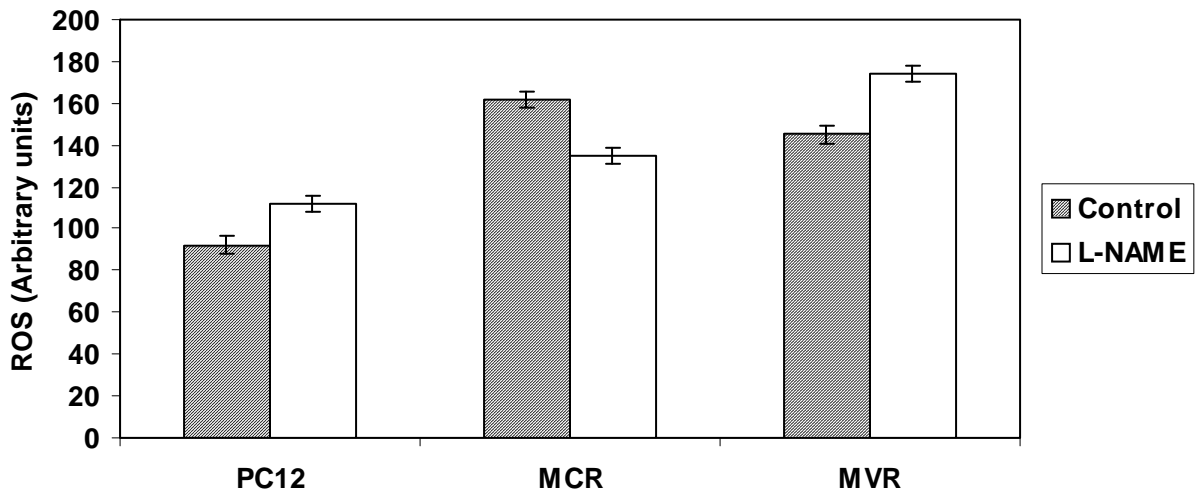
სურათი 3. c-Fos-ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილება M-M17-26 და M-CR3B უჯრედების L-NAME (1mM) და მანუმეცინით(10 μ M) 24 საათიანი დამუშავებისას შედეგად



სურათი 4. NF κ B -ფაქტორის დნმ-დამაკავშირებელი აქტივობის ცვლილება M-M17-26 და M-CR3B უჯრედების L-NAME (1mM) და მანუმეცინით(10 μ M) 24 საათიანი დამუშავების შედეგად. მონაცემები მოყვანილია A₄₅₀ მკგ ცილაზე

უჯრედის ტიპები და დამატებები	SAM nM	SAH nM	SAM/SAH
დამატებების გარეშე			
PC12	170 ± 24	197 ± 37	0.86
M-CR3B	295 ± 45	142 ± 24	2.07
MVR	566 ± 82	275 ± 49	2.05
+ მანუმიცინი			
PC12	162 ± 24	222 ± 37	0.74
M-CR3B	88 ± 22*	181 ± 37	0.46
MVR	598 ± 93	303 ± 53	1.97
+L-NAME			
PC12	434 ± 72	250 ± 54	1.73
M-CR3B	778 ± 114*	89 ± 13*	8.74
MVR	86 ± 23*	451 ± 91*	0.19
+ მანუმიცინი + L-NAME			
PC12	281 ± 49	237 ± 36	1.18
M-CR3B	795 ± 132*	66 ± 11*	12.0
MVR	76 ± 22*	432 ± 95*	0.19

ცხრილი 1 L-NAME (1mM) და მანუმიცინის (100M) გავლენა SAM-ის და SAH-ის დონეზე, SAM/SAH ფარდობაზე M-CR3B, MVR და PC-12 უჯრედებში. (HPLC ანალიზი).



სურათი 5. სუპეროქსიდრადიკალისა და H₂O₂-ის პროდუქციის განსაზღვრა PC12, M-CR3B და MVR უჯრედებში ქემილუმინისცენციის მეთოდით.

«სქემა 1. Ras-ის პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების გავლენა ჰომოცისტინის მეტაბოლიზმზე.

