

юридическое лицо публичного права  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И БИОФИЗИКИ

*На правах рукописи*

**Маиа Сепашвили**

**РОЛЬ МЕТАБОЛИЗМА ГОМОЦИСТЕИНА В ИНИЦИАЦИИ  
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ**

03.00.03 – молекулярная биология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**диссертации, представленной на соискание научной степени кандидата биологических наук**

Тбилиси  
2006

Работа выполнена в Институте Физиологии им. И. Бериташвили  
Академии Наук Грузии

Научный руководитель: **Давид Микеладзе**,

доктор биологических наук, профессор

Официальные опоненты: **Тенгиз Самсонидзе**

доктор биологических наук, профессор

**Нана Кошоридзе**

доктор биологических наук, профессор

**Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2006 года, в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета по защите диссертации (В. 03-03-N1) Института Биофизики и Молекулярной Биологии.**

Адресс: 0160, Тбилиси, ул. Готуа 12.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Биофизики и Молекулярной Биологии.

Адресс: 0159, Тбилиси, ул. Готуа 12

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

Ученый секретарь диссертационного совета,

к.б.н. Н. Джапаридзе

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы:** В последние годы в клинической и теоритической медицине особенный интерес вызывают проблемы, связанные с систематической гибелью нервных клеток, которая обнаруживаются в большинстве острых и хронических неврологических заболеваний. В развитии сердечно-сосудистых заболеваний (атеросклероз, тромбоз) повышенный уровень гомоцистеина считается одним из риск-факторов. Нужно отметить, что многочисленные экспериментальные и эпидемиологические исследования показали тесную связь между депривацией фолата, дефицитом кобаламина, повышенным уровнем гомоцистеина и некоторыми нейродегенеративными заболеваниями [Mattson, M.P. et al 2003].

Гомоцистеин представляет собой серосодержащую, небелковую нейротоксичную аминокислоту, которая синтезируется из метионина и занимает ключевое место в метильном цикле. В организме метаболизм гомоцистеина происходит в трёх направлениях: либо он превращается в метионин (путь реметилирования), либо включается в цикл синтеза цистеина (и соответственно глутатиона), либо в неизменённом виде диффундирует во внеклеточное среде. Третий путь считается непосредственной причиной повышения общей концентрации гомоцистеина во внеклеточных жидкостях (плазма и моча). [Medina M.A. et.al 2001].

Гипергомоцистеинемия вызывает цереброваскулярные заболевания, инфаркт, некоторые неврологические и психические расстройства, включая депрессию, заболевания Альцгеймера и Паркинсона. В результате повышения уровня гомоцистеина развиваются такие осложнения, как например, дефект нервной трубки плода у беременных, нарушения когнитных функций, псориаз, деменция, шизофрения и некоторые виды опухолей. Литературными данными подтверждается, что метаболит гомоцистеина - гомоцистеиновая кислота представляет собой нейротоксин центрального действия и свой эксцитотоксичный эффект выявляет путём стимуляции NMDA-рецептора. Гипергомоцистеинемия может вызвать деменцию различными путями, например, снижением церебральной микроциркуляции, эндотелиальной дисфункцией и оксидационным стрессом,  $\beta$ -амилоидной пептидозависимой усиленной нейротоксичностью и апоптозом нервных клеток [Ho et.al 2001].

Известно, что повышение уровня гомоцистеина связано с оксидационным стрессом, так как данная аминокислота является предшественником главного клеточного антиоксидантного соединения - глутатиона. Во время оксидационного стресса образуются свободные радикалы, которые изменяют окислительно-восстановительные процессы, происходящие внутри клетки, и в результате развивается апоптоз [White B.et el. 2000]. В клетке, активированные в результате изменения редокс-статуса регуляторные системы повышают транскрипционную активность клетки и экспрессию генов, участвующих в стресс-реакции [Morel Y.et al. 1999]. Среди этих систем самыми важными являются редокс-чувствительные регуляторные системы, которые включают Ras-белок и транскрипционные факторы - NF-kB и c-Fos. Эти регуляторные системы могут индуцировать экспрессию как проапоптотических, так и антиапоптотических генов [Castagne M.1999].

Ras-белки относятся к семейству протоонкогенов, которые являются важными компонентами внутриклеточных сигнальных путей и контролируют такие процессы, как пролиферация, дифференциация и запрограммированная гибель клетки [Bredel et. al 1999]. Регуляция функционирования Ras-белков осуществляется посредством изменения GTP-азной активности и путём посттрансляционных модификаций, таких как фарнезилирование, геранилирование, палмитирование, метилирование и т.д. [Takai et al. 2001]. Современные данные подтверждают предположение об участии Ras-белка в метаболизме гомоцистеина [Wang et al.1992]. Но точные молекулярные механизмы его действия неизвестны, что и даёт основание для его дальнейшего изучения.

Изучение метаболизма гомоцистеина и участвующих в нём соединений даёт возможность определить точные механизмы патологических процессов, вызванных нарушением нормального метаболизма гомоцистеина, что является весьма актуальным для современной медицины. Успешное решение этой проблемы позволит выявить направление терапевтического вмешательства в этиопатогенез различных заболеваний и сделает возможным коррекцию этих патологических процессов на молекулярном уровне.

**Цель и задачи исследования:** Целью исследования являлось определение молекулярных механизмов регуляции метильного цикла и биосинтеза гомоцистеина. Для осуществления этой цели были поставлены следующие задачи:

- выяснить участие Ras протоонкопротеина в регуляции метаболизма гомоцистеина в клеточных линиях феохромоцитомы, M-CR3B-3B и MM17-26.
- изучить влияние нитрозолирования и фарнезилирования Ras-белка на продукцию гомоцистеина в клеточных линиях феохромоцитомы, M-CR3B-3B и MM17-26.
- выявить корреляцию между уровнем гомоцистеина и жизнеспособностью клеток в клеточных линиях феохромоцитомы, M-CR3B-3B и MM17-26.
- определить корреляцию между изменением ДНК-связывающей активностью редокс-чувствительных транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и c-Fos и метаболизмом гомоцистеина в клеточных линиях феохромоцитомы, M-CR3B-3B и MM17-26.
- изучить влияние нитрозолирования и фарнезилирования Ras-белка на метаболизм S-аденозилгомоцистеина и S-аденозилметионина в 3 клеточных линиях феохромоцитомы, M-CR3B-3B, MVR и PC12.
- выяснить влияние нитрозолирования и фарнезилирования Ras-белка на соотношение SAM/SAH клеточных линиях феохромоцитомы, M-CR3B-3B, MVR и PC12.

**Научная новизна работы.** Впервые было показано, что в метаболизме гомоцистеина важную роль играют посттрансляционные модификации Ras-белка. Впервые выяснилось, что в условиях дефицита трофических факторов ингибирование фарнезилирования манумицином вызывает уменьшение уровня гомоцистеина и повышение жизнеспособности клеток, в то время как ингибирование нитрозолирования повышает уровень гомоцистеина и уменьшает жизнеспособность клеток. Впервые была выявлена корреляция между посттрансляционными модификациями Ras-белка, транскрипционными факторами NF- $\kappa$ B и c-Fos и жизнеспособностью клеток. Впервые было исследовано, что посттрансляционные модификации Ras-белка влияют на концентрацию соединений, участвующих в метаболизме гомоцистеина и их соотношение. Впервые было высказано предположение, что Ras-белок в условиях дефицита трофических факторов осуществляет свое влияние на метаболизм гомоцистеина и соответственно на жизнеспособность клеток через Ras/NADPH оксидазную систему.

**Практическая ценность работы.** Результаты проведенных исследований позволяют выяснить этиологию гомоцистеин-индуцируемых нейродегенеративных патологий и разработать стратегию соответствующей фармакологической интервенции. Принципы регуляции метильного цикла, метаболизма гомоцистеина и нисходящих сигнальных путей в клетке могут быть использованы для выяснения механизмов нейродегенеративных процессов.

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

- 20 объединённом съезде международного и европейского нейрохимических обществ, (2005г Иннсбрук., Австрия)

- V Форуме Нейронауки Европы (2006г., Вена, Австрия)
- 6-ом Съезде Азия-Тихоокеанского Нейрохимического Общества (2006г., Сингапур)
- 31-ом Конгрессе Европейского Биохимического Общества (2006г., Стамбул, Турция)
- Объединенном заседании лабораторий нейрохимии и биохимической нейрофармакологии Института Физиологии им.И.Бериташвили (1 июня, 2006г.)

**Публикации.** На тему диссертации опубликовано 3 статьи и 6 тезисов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 101 странице компьютерной печати и содержит вступление, обзор литературы, описание материала и методики исследования, обсуждение полученных результатов, выводы и библиографию (153 источника). Диссертация иллюстрирована 18 рисунками и одной схемой. Работа выполнена на грузинском языке.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования:** В экспериментах были использованы 4 клеточные линии феохромоцитомы— исходные клетки PC12, MVR клеточная линия -PC12 клетки, в которых был трансфицирован доминант-позитивный мутантный c-gasH ген (в 12-ой позиции глицин заменён валином), M-CR3B-3B клеточная линия - PC12 клетки, в которых сверхэкспрессирован c-gasH ген, MM17-26 с доминант-негативным Ha-Ras-геном. Данные клеточные культуры были получены профессором Дж. Зеберини (Печь, Венгрия).

**Определение жизнеспособности клеток.** [Miyamoto M. et al, 1989]. После инкубации с различными соединениями определяли активность фермента лактатдегидрогеназы (LDH) в недосадочной жидкости. Активность определялась в 65 mM Tris-HCl буфере, содержащем 1 mM пирувата, 0.3 mM NADH; 5mM MgCl<sub>2</sub>. С помощью спектрофотометра (Jenway 6300) при 340 nm измерялась концентрация NADH.

Оставшиеся в осадке клетки подвергались лизису в специальном лизисном буфере: 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF, 1mM дититреитол, 1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1% Triton-X100, 10µg/ml аprotинин, 10µg/ml леупептин, 50mM HEPES буфер pH7,5. Лизис клеток проводили в течении 30 минут при температуре 0°C-3°C. Полученный в результате центрифугирования (3000 об/мин, 20 минут, 4°C) супернатант подвергался анализу на активность LDH вышеописанным методом. жизнеспособность клеток высчитывалась следующей формулой:

$$\frac{\text{LDH активность в I супернатанте}}{\text{LDH акт. в I супернатанте} + \text{LDH в II супернатанте}} \times 100\% = \text{жизнеспособность}$$

---

LDH акт. в I супернатанте + LDH в II супернатанте

**Определение уровня гомоцистеина:** Уровень гомоцистеина в питательной среде определялся методом Пфаифера [Pfeiffer et al. 1999] с использованием HPLC (Жидкостная Хроматография Высокого Давления).

**HPLC оборудование и условия хроматографии:** В экспериментах была использована Waters HPLC система [Milford MA, USA]. Для разделения проб использовалась аналитическая колонка Waters Nova-Pak C 18 (100 мм, 83,2 мм, гранулы 5 мкм) и флуоресцентный детектор (возбуждение 385 нм, эмиссия 515 нм).

Для разделения образцов в виде мобильной фазы использовался кислый буффер (pH5,5), который содержал 3%-ый метанол, скорость потока 0,7 мл/мин., температура колонки 29°C. Стандартный гомоцистеин и цистеин растворялись в PBS буффере pH7,0; внутренним стандартом считался цистамин. 100мкл стандартного образца содержал 10мкл стандартного вещества. Образцы инкубировались в течение 1 часа при температуре 60°C.

**Анализ SAM и SAH:** Уровень SAM и SAH определялся в питательной среде методом, описанным в литературе с некоторыми модификациями. Для определения использовалось жидкостная хроматография высокого давления (HPLC).

**HPLC оборудование и условия хроматографии:** В экспериментах была использована система Waters HPLC [Milford MA, USA]. Разделение образцов проводилось колонкой Waters Nova-Pak C 18 (250 мм, 4,6 мм, 5 мкм гранулами). Мобильная фаза состояла из двух растворов: раствор А (8 мМ натриевой соли октасерной кислоты и 50 мМ дигидрофосфата натрия, pH3,0 ) и раствор В(100% метанол). Перед использованием раствор фильтровался через 0,2 мкм фильтр. HPLC колонка уравнивалась 80% А и 20% В растворами. Разделение образцов проводилось с использованием градиента, продолжалось 8 минут в условиях уравнивания и последующие 10 мин. концентрация раствора В достигала 40 %. В течении последних 3 мин. концентрация возвращалась в уравнишенное состояние и так продолжалось 10мин. до введения следующего образца. Скорость потока 1мл/мин. Определение соединений происходило при длине волны 254 нм. Эксперимент проводился при комнатной температуре.

Идентификация SAM и SAH происходило по временам ретенции, которое фиксировалось при одновременном введении стандартов SAM и SAH. Количественная оценка основывалась на вычислении соотношения пиков, в тоже время сравнивалась калибрационная кривая стандартов (SAM и SAH). Результаты изображены в наномолях на 1 мл среды.

Стандарты SAM и SAH растворялись в воде до концентрации 0,1 mM и затем разводились перхлорной кислотой до концентрации 0,4 M, которая использовалась для HPLC анализа. 25мкл стандартного раствора, которые содержали 50,100, 500, 1000 и 5000 пмоль/образец стандартного вещества было использованно для HPLC анализа.

**Приготовлении образцов:** После 24 часовой инкубации клеточной культуры с различными соединениями была извлечена питательная среда, в которую для осаждения белков добавлялся HClO<sub>4</sub> до конечной концентрации 0,4 M. После взбалтывания образцы центрифугировались при 10000 g в течении 20 мин. Полученный супернатант подвергался HPLC анализу.

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

**Определение уровня ROS:** Уровень ROS определялся методом хемилюминисценции. Увеличение хемилюминисценции, вызванное добавлением люминола использовалось для определения ROS. 5mM люминол (5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазинедин), разведённый диметилсульфоксидом и 1µg/ml пероксидаза-конъюгированных вторичных антител добавлялись в клеточный экстракт (1x10<sup>6</sup> клетки). Измерение проводилось на сцинтиляторомном счётчике (Beckman,одно-фотонный монитор).

## Полученные результаты и их обсуждение

### I. Влияние посттрансляционных модификаций Ras-белка на внутриклеточный уровень гомоцистеина в клеточных культурах феохромоцитомы MM17-26 и M-CR3B-3B.

В литературе существуют данные о том, что Ras протоонкопротеин непосредственно включён в регуляцию внутриклеточного окислительно-восстановительного статуса. Он подвергается ряду посттрансляционных модификаций, таким как фарнезилирование, геранилирование, палмитирование, метилирование, но роль этих модификаций в специфичности нисходящих эффекторов не изучена. Влияние посттрансляционных модификаций Ras- протоонкопротеина - нитрозолирования и фарнезилирования конкретно изучалось в следующих клеточных линиях: MM17-26 клеточная линия с доминант негативным c-gasH геном и M-CR3B-3B клеточная линия с оверэкспрессивным gasH геном. Для каждой клеточной культуры в отдельности было взято по 4 образца: I образец представлял собой чистую клеточную культуру, она инкубировалась в течении 24 часов в условиях дефицита трофических факторов, которая использовалась в качестве контроля. II образец - в питательную среду клеточной культуры добавлялся ингибитор фарнезилирования - манумицин, в концентрации 10  $\mu$ M.; III образец- в питательную среду клеточной культуры добавлялся ингибитор нитрозолирования L-NAME (1mM); IV образец - в питательную среду клеточной культуры добавлялись оба ингибитора - ингибитор фарнезилирования манумицин и ингибитор нитрозолирования L-NAME.

Инкубация клеточной культуры с соответствующими соединениями продолжалась 24 часа. После 24 часовой инкубации в питательной среде определялась концентрация гомоцистеина методом ВЭЖХ. В результате проведённых экспериментов оказалось, что в обеих клеточных линиях в условиях дефицита трофических факторов имело место продукция гомоцистеина. В M-CR3B-3B клетках количество гомоцистеина уменьшалось под действием манумицина и увеличивалось в присутствии L-NAME, но при наличии обоих ингибиторов уровень гомоцистеина приближался к контрольному значению (рис.1). Таким образом, было выяснено, что в результате фарнезилирования Ras белка количество гомоцистеина увеличивается, а во время нитрозолирования Ras-белка - уменьшается. В случае немодифицированного Ras-белка уровень гомоцистеина не изменялась. В MM17-26 клеточных линиях с доминантнегативным Ha-gas геном действие L-NAME и манумицина на продукцию гомоцистеина было незначительным (рис.1), что указывает на участие Ras-белка в регуляции метаболизма гомоцистеина.

Для установления корреляции между концентрацией гомоцистеина и жизнеспособностью клеток в культуре проводилась инкубация вышеуказанных клеток с манумицином (10 $\mu$ M) и L-NAME(1mM). После 24 часовой инкубации с ингибиторами фарнезилтрансферазы и синтазы азота оксида жизнеспособность клеток определялась по количеству высвобождающейся LDH (лактатдегидрогеназа) (LDH тест). В результате произведенных исследований выяснилось, что после инкубации с манумицином и L-NAME жизнеспособность клеток не изменяется в MM17-26 клеточной линии, т.е. действие L-NAME и манумицина не вызвал апоптоз MM17-26 клеток (рис.2).

В случае M-CR3B-3B клеточной линии в результате действия L-NAME активность внеклеточного LDH возрастает (рис.2). т.е. L-NAME уменьшает жизнеспособность клеток, соответственно нитрозолирование Ras-белка увеличивает количество выживших клеток. Нужно отметить, что этот эффект обнаруживался только в M-CR3B-3B клеточной линии.

Полученные нами данные указывают на то, что нитрозолирование Ras-белка необходимо для поддержания жизнеспособности PC12 клеток феохромоцитомы, а фарнезилирование Ras-белка в условиях дефицита трофических факторов стимулирует апоптоз.

Для установления нисходящих эффекторов Ras-белка определялась ДНК-связывающая активность определенных транскрипционных факторов. Известно, что в условиях дефицита трофических факторов в клетке накапливаются реактивные формы кислорода (ROS), которые влияют на метаболизм гомоцистеина, а Ras-белок и нисходящие пути могут сыграть значительную роль в регуляции внутриклеточного редокс-статуса. Поскольку NF- $\kappa$ B и c-Fos представляют собой редокс-чувствительные транскрипционные факторы, определялась их ДНК-связывающая активность в ядерных экстрактах MM17-26 и M-CR3B-3B клеток в условиях дефицита

трофических факторов после 24 часовой инкубации с ингибиторами фарнезилтрансферазы и синтазы оксида азота. В результате произведенных экспериментов выяснилось, что в M-CR3B-3B клетках манумидин увеличивает ДНК-связывающую активность c-Fos (рис 3). и уменьшает активность NF-kB (рис. 4), в то время как L-NAME снижает активность обоих транскрипционных факторов. Основываясь на вышеизложенных результатах, можно сделать вывод, что фарнезилирование Ras-белка необходимо для активирования этих транскрипционных факторов. Также выяснилось, что уменьшение концентрации NO, вызванное действием L-NAME уменьшает активность NF-kB, а в присутствии обоих ингибиторов, L-NAME и манумидина активность NF-kB приближается к нормальному контрольному уровню (рис 4). По сравнению с M-CR3B-3B клеточной линии в MM17-26 клетках ингибирование фарнезилирования, вызванное манумидином, не изменяет активность ни c-Fos-а (рис 3.), ни NF-kB(рис 4).

Полученные данные указывают на то, что нитрозолирование и фарнезилирование Ras-белка изменяют активность обоих транскрипционных факторов NF-kB и c-Fos, в частности, фарнезилирование Ras-белка уменьшает активность c-Fos и увеличивает активность NF-kB, а нитрозолирование Ras-белка увеличивает активность обоих транскрипционных факторов NF-kB и c-Fos.

Известно, что в условиях дефицита трофических факторов в недифференцированных PC12 клетках феохромоцитомы в большом количестве образуются реактивные формы кислорода (ROS), которые изменяют внутриклеточный окислительный-восстановительный потенциал и нарушают метаболизм гомоцистеина. Принимая во внимание эти данные, можно заключить, что Ras-белок играет определенную роль в регуляции внутриклеточного окислительно-восстановленного статуса, по-видимому путём Ras/NADPH оксидазной системы [Li C. et al 2002. Tammariello S.P. 2000].

Оксидационный стресс имеет место во время гибели нейронов, которая вызвана многими факторами, например: инсультом, травмами и т.д. Одним из этих факторов также является дефицит факторов роста [Nikolls D.G. et al, 2000] Ras-белок представляет собой основной клеточный компонент, который участвует во внутриклеточной регуляции и ответственен за регуляцию процессов, вызванных оксидационным стрессом. Свой эффект Ras-белок осуществляет посредством действия на нисходящие эффекторные молекулы, в результате чего регулируется активность нескольких транскрипционных факторов [Santillo et al.2001]. Используя 2 клеточные линии феохромоцитомы - с доминант-негативным и сверхэкспрессированным gas геном, нами выяснено, что в условиях дефицита трофических факторов ингибирование фарнезилирования и изменения уровня оксида азота изменяют ДНК-связывающую активность c-Fos и NF-kB транскрипционных факторов только в клетках со сверхэкспрессированным gas геном, в присутствии обоих ингибиторов значительный эффект не проявлялся.

Увеличение уровня гомоцистеина было обнаружено в условиях депривации фолата в нейронах гипокампа и эмбрионной коры, в которых протекал апоптоз [Ho P.I. 2003; Kruman T.S. 2002]. Увеличение уровня гомоцистеина часто коррелирует с накоплением ROS. Исходя из этого предположения оксидационный стресс представляет собой значительный фактор для скопления гомоцистеина. Если метионинсинтаза инактивируется в результате окисления, то цистатион-β-синтаза активна при окислении. [Danishpajoooh I. O et al. 2001. Krumfnn T. S. 2002] Оксидационный стресс может вызвать уменьшение реметилирования и увеличение транссульфирования, что приводит к увеличению уровня гомоцистеина. В результате наших исследований выяснилось, что добавление L-NAME вызывает увеличение транссульфирования, в то время как манумидин снижает синтез этой аминокислоты в клетках M-CR3B-3B типа. Эти наблюдения указывают на то, что физиологический уровень оксида азота регулирует метаболический путь ресинтеза гомоцистеина и балансирует окислительно-восстановительные системы путём Ras системы.

Интересная корреляция отмечается между секретированием гомоцистеина и ДНК-связывающей активностью c-Fos-а. Уменьшение активности c-Fos-а в M-CR3B-3B клетках связано с увеличением уровня гомоцистеина и, наоборот, увеличение активности c-Fos коррелирует с

уменьшением продукции гомоцистеина. Возможно гомоцистеин использует определенные механизмы для действия на сигнальные процессы, в результате чего происходит экспрессия генов в PC12 клетках. Оказалось, что, как ингибитор метилирования белков, он также подавляет формирование нейронов вызванное факторами роста. Наверное, этот процесс осуществляется путем блокировки метилирования белков [Cimato T.R. 1997]. Наоборот, в результате обработки гомоцистеином нейронов коры обнаружено увеличение фосфорилирования тау-белка ERK путём, это сигнальный путь, который стимулирует экспрессию и фосфорилирование c-Fos и Ap-1 усиливает связывание активного комплекса с ДНК [Ho. P. I et al.2002]. Полученные нами результаты совпадают с существующими исследованиями: увеличение уровня гомоцистеина изменяет связывание c-Fos с ДНК в PC12 клетках. С другой стороны обнаружена положительная корреляция между секретированным гомоцистеином и жизнеспособностью M-CR3B-3B клеток. Такая взаимозависимость замечается только в случае сверхэкспрессированного Ras, в то время как в MM17-26 клетках такая корреляция не наблюдается. Кроме этого, обнаружилось, что манумицин увеличивает активность c-Fos-a в M-CR3B-3B клетках. Таким образом, исходя из изложенных данных в условиях дефицита факторов роста, в результате оксидационного стресса накапливается гомоцистеин и концентрация этой аминокислоты подавляет ДНК-связывающую активность c-Fos . Известно, что митогенный стимул действует на ERK и активирует AP-1 [Hu. Q. et al. 1995. Kyriakis J. et al. 2001]. Так как дефицит факторов роста в PC12 клетках феохромоцитомы вызывает активирование JNK и p38 протеинкиназ и подавление ERK активности [Xia Z. et al.1995], можно предположить, что подавление активности c-Fos в наших экспериментах обусловлено несовместимостью субъединиц комплекса AP-1.

В результате проведенных экспериментов выяснилось, что уменьшение концентрации оксида азота, вызванное действием L-NAME, ускоряет апоптоз клеток M-CR3B-3B типа, но этот ингибитор не изменяет жизнеспособность клеток типа MM17-26. Кроме этого обнаружилось, что L-NAME уменьшает активность c-Fos и соответственно вызывает усиленную продукцию гомоцистеина. После ингибирования синтазы оксида азота жизнеспособность изменяется только M-CR3B-3B клетках. Можно предположить, что уменьшение оксида азота напрямую влияет на Ras и этот эффект не опосредован нитрозолированием другого регуляторного белка, например, такого как c-Fos [Droge W. et al. 2002]. Полученные нами результаты совпадают с результатами Тенга [Teng K. K. 1999]. Активирование c-Ha-Ras-a оксидом азота изменяет жизнеспособность клеток PC12 и защищает их от апоптоза.

В результате действия манумидина уменьшается активность NF- $\kappa$ B в M-CR3B-3B клетках, что указывает на то что фарнезилирование Ras-белка необходимо для активации этого транскрипционного фактора. Выяснилось, что уменьшение концентрации NO, вызванное L-NAME уменьшает активность NF- $\kappa$ B, но парадокс заключается в том, что в присутствии обоих ингибиторов (и манумидина, и L-NAME) активность NF- $\kappa$ B возвращается к нормальному контрольному уровню. Эти данные указывают на то, что нефарнезилированный и нитрозолированный Ras-белок действует на те же нисходящие эффекторы, что и дважды модифицированный Ras. Полученные нами результаты совпадают с данными Берго [Bergo M.O 2004]. Метилирование SAAX карбоксильной группы белка влияет на Ras, но оказывает очень слабое или почти никакое влияние на специфичность нисходящих эффекторов. Фарнезилированный Ras подвергается модифицированию специальными SAAX протеазами, в результате чего встраивается в плазматическую мембрану, где и продолжается палмитирование многочисленных цистеиновых остатков Ras белка. Исходя из этого, S-нитрозолирование цистеиновых остатков Ras белка имеет большое значение, так как мешает Ras белку во включении в мембрану.

Таким образом, на основании наших результатов можно сделать вывод, что в условиях дефицита факторов роста происходит активирование Ras-белка (предположительно Ha-ras), который используя Ras/NADPH оксидазную систему вызывает перманентный оксидационный стресс. В результате оксидационного стресса скапливаются активные формы кислорода, радикалы

которого вызывают ингибирование метионинсинтазы и накопление гомоцистеина, ускоряющего апоптоз.

## **II. Действие посттрансляционных модификаций Ras-белка на продукцию S-аденозилметионина и S-аденозилгомоцистеина в V-12 H-Ras и M-CR3B-3B клеточных линиях феохромоцитомы.**

Действие посттрансляционных модификаций - фарнезилирования и нитрозолирования на метаболизм и продукцию соединений метильного цикла - S-аденозилметионина (SAM) и S-аденозилгомоцистеина (SAH), было изучено в следующих клеточных линиях: PC12 клетках феохромоцитомы, MVR клеточная линия с мутантным, онкогенным Ras геном и M-CR3B-3B клеточная линия со сверхэкспрессированным *ras-H* геном [Szeberenyi et al.1990]. Для исследования влияния фарнезилирования и нитрозолирования Ras-белка на метаболизм метилового цикла были использованы L-NAME и манумицин, ингибиторы синтазы оксида азота и фарнезилтрансферазы соответственно. Для каждой клеточной линии в отдельности были взяты следующие образцы: I образец представлял собой чистую клеточную культуру без добавок, который использовался для контроля. II образец - в питательную среду клеточной культуры добавлялся ингибитор фарнезилирования манумицин, в концентрации 10  $\mu$ M; III образец - в питательную среду клеточной культуры добавлялся ингибитор нитрозолирования L-NAME (1mM); IV образец - в питательную среду клеточной культуры добавлялись оба ингибитора - ингибитор фарнезилирования манумицин и ингибитор нитрозолирования L-NAME. Инкубация клеточной культуры с манумицином и L-NAME продолжалась 24 часа, после чего в питательной среде культуры определялась концентрация SAM и SAH с использованием метода HPLC. В результате анализа проведенных исследований выяснилось, что уровень SAM увеличивается под действием L-NAME в PC12 и M-CR3B клетках, а в MVR клетках его продукция значительно уменьшается (рис 9.).

В результате действия ингибитора фарнезилирования проявляется противоположный эффект, т.е. в M-CR3B клеточной культуре количество SAM уменьшается в M-CR3B клетках, в MVR клетках увеличивается, а в PC12 клетках уровень этого соединения остается без изменения (таблица 1). Эти результаты указывают на то, что фарнезилирование Ras-белка вызывает увеличение уровня SAM в M-CR3B клетках, а в MVR клетках имеет противоположенный эффект. При одновременном действии ингибиторов фарнезилирования и нитрозолирования количество SAM увеличивается как в PC12 клетках, так и в M-CR3B клетках, в то время как в MVR клетках уменьшается (таблица 1). Эти данные ещё раз подтверждают влияние посттрансляционных модификаций на уровень SAM.

В следующей серии опытов был определен уровень второго метаболита метильного цикла - SAH в PC12, M-CR3B и MVR клетках методом HPLC. В результате анализа проведенных экспериментов выяснилось, что в M-CR3B клетках в присутствии L-NAME количество SAH уменьшается, в то время как в MVR клетках продукция SAH заметно увеличивается (таблица 1). Что касается влияния манумицина на уровень SAH в M-CR3B клетках, после обработки манумицином уровень SAH увеличивается в PC12, M-CR3B и MVR клетках (таблица 1), что указывает на то, что фарнезилирование Ras-белка уменьшает уровень метаболита метильного цикла SAH во всех трёх клеточных типах феохромоцитомы. Одновременное действие обоих ингибиторов фарнезилирования и нитрозолирования показало, что уровень SAH значительно уменьшается в M-CR3B клеточной линии, увеличивается в MVR клетках, а в PC12 клетках значительно увеличивается (таблица 1). Эти данные указывают на то, что в случае немодифицированного Ras белка имеет место уменьшение SAH и соответственно увеличение процессов метилирования в M-CR3B клетках, а в клетках с онкогенным Ras белком проявляется

противоположный эффект, что ещё раз указывает на то, что онкогенный Ras обеспечивает включение совершенно иных сигнальных путей.

На основании вышеприведенных данных выяснилось, что для характеризирования метаболизма гомоцистеина важно изучить уровень метаболитов метильного цикла SAM и SAH, соответственно показатель их соотношения может быть представлен, как один из основных критериев для характеристики метаболизма гомоцистеина. Учитывая вышеизложенное было определено соотношения SAM/SAH в PC12, M-CR3B и MVR клетках в результате действия ингибиторов посттрансляционных модификаций фарнезилрования и нитрозолирования. После анализа проведенных экспериментов выяснилось что L-NAME значительно изменяет соотношения SAM/SAH в M-CR3B и MVR клетках. В M-CR3B клетках в результате действия L-NAME соотношение SAM/SAH увеличивается, в то время как в MVR клетках это соотношение уменьшается. В результате действия манумидина SAM/SAH соотношение значительно уменьшается в M-CR3B клетках (таблица 1), а в MVR клетках эти изменения незначительны. В результате одновременного действия ингибиторов фарнезилтрансферазы и синтазы оксида азота SAM/SAH соотношение значительно уменьшается в M-CR3B клетках, а в MVR клетках изменение было незначительным (таблица 1).

Так как в условиях оксидационного стресса включаются абсолютно специфические процессы, одной из целей наших исследований было определение продукции ROS. Для этого использовались PC12, M-CR3B и MVR клетки, в которых определялись свободные радикалы методом хемилюминисценции. Выяснилось, что в M-CR3B и MVR клетках накапливается больше ROS, чем в PC12 клетках, а в клетках обработанных L-NAME, продукция ROS значительно уменьшается только в M-CR3B клетках. Принимая во внимание, что изменение количества ROS коррелирует с биосинтезом SAM и SAH, можно предположить, что внутриклеточные супероксиданионрадикалы регулируют метильный цикл (рис.6).

Известно, что SAM представляет собой основной донор метильных групп и около 300 метилтрансфераз могут использовать это соединение для метилирования фосфолипидов, нуклеиновых кислот, нейротрансмитеров и белков [Katz J. E. 2003]. Уменьшение SAM/SAH соотношения негативно отражается на метаболизме ДНК, меняет активность метилтрансфераз, что и обуславливает усиленную геномную нестабильность опухолевых клеток, полученных путем митозной рекомбинации. Понижение геномного метилирования представляет частое и раннее явление онкологических процессов, и во многих типах опухолей коррелирует с тяжестью заболевания и с метастазным потенциалом. Кроме того выяснено, что дефицит фолат/метионина вызывает канцерогенез, за которым следует уменьшение SAM и, несмотря на усиленную активность ДНК-метилтрансферазы, вызывает гиппометилирование генома [James JS, 2003]. Поскольку после повышения активности ДНК-метилтрансферазы, вызванного онкогенным Ras-белком [MacLeod AR, 1995], усиливается оксидационный стресс [Cho H-J, 2002], можно предположить, что окислительное ингибирование метионинсинтазы, которому сопутствует активирование транссульфирования и пониженный ресинтез SAM, стимулирует синтез аберантного ДНК и неоплазию.

Полученными нами данными выясняется, что L-NAME значительно изменяет SAM/SAH соотношение в M-CR3B и MVR клетках. Эти изменения в метильном цикле носит обратно пропорциональный характер, в результате действия L-NAME SAM/SAH соотношение повышается в M-CR3B клетках, в то время как в MVR клетках это соотношение понижено (таблица 1). Очевидно, что эти изменения представляют результат активирования двух ферментов: цистатион- $\beta$ -синтазы, которая катаболизирует превращение гомоцистеина в цистатион (путь транссульфирования) и последовательно в глутатион, и метионинсинтазы, которая превращает гомоцистеин в метионин (путь реметилирования). Если внутриклеточное SAM/SAH соотношение указывает на уровень трансметилирования, то можно предположить, что L-NAME понижает уровень реметилирования в MVR клетках, а в M-CR3B клетках повышается уровень ресинтеза SAM. Необходимо учитывать,

что при окислении метионинсинтаза инактивируется, и для реактивности она нуждается в восстановительном метилировании [Danishpajooch IO, 2001], а цистатион- $\beta$ -синтаза, в состав которой входит железо, наоборот, активна в окисленной форме [Таока S., 1998]. Можно предположить, что понижение реметилирования в MVR клетках вызвано увеличением оксидационного стресса.

Ras/Rac1/NADPH оксидационный путь опосредывает продукцию ROS, вызванную онкогенным H-Ras-белком, и существует прямая связь между активацией Ras/PI3K/Rac1/NADPH оксидационного пути и жизнеспособностью, например NIH3T3 клеток. Ras трансформированные клетки производят внутриклеточный ROS в NIH3T3 клетках [Irani et al., 1997], в кератиноцитовых HaCaT клетках человека [Yang et al., 1999], и в WI-38VA-13 клетках легких [Liu et al., 2001]. Данная продукция ROS происходит с помощью Rac-зависимой активации фермента NADPH оксидазы, локализованной в мембране нефагоцитных клеток. Существуют данные, что кратковременное повышение продукции ROS функционально связано с регуляцией экспрессии генов с участием таких транскрипционных факторов, как NF- $\kappa$ B, AP-1 и Sp1 [Thannickal et al., 2000; Ishii et al., 2000]. Однако, роль ROS в трансдукции онкогенного сигнала остаётся неизвестной.

Противоположенный эффект действия L-NAME в MVR и M-CR3B клетках остается необъясненной. Показано, что соединения – доноры оксида азота могут стимулировать обмен палмитина в Ha-Ras белке в PC12 клетках, и основным результатом этой стимуляции может быть ускорение депальмитирования [Baker T.L., 2000]. Кроме того, эндогенный NO может регулировать метильный цикл потоком железа и активированием цистатион- $\beta$ -синтазы. Как показали полученные нами результаты, отсутствие эндогенного NO, уменьшает SAM/SAH соотношение только в V12-H-Ras доминант-позитивных PC12 клетках (таблица 1). Можно предположить, что понижение конституционного уровня оксида азота может изменить метильный цикл путем увеличения продукции ROS, которое регулируется онкогенным Ras-белком.

Полученные результаты указывают на то, что ацилированный, связанный с мембраной Ras отличается от внутриклеточного. По-видимому, модифицирование терминального COOH участка ацилированного, связанного с мембраной онкогенного (мутантного) Ras белка отличается от нормального. В H-Ras белке встречаются структурные изменения в COOH-терминальном домене. В том случае, когда C- терминальный домен Ras белка принимает участие в трансформации [Maher et al., 1995] и C- терминальный цистеиновый остаток H-Ras является нитрозолированным, понижение уровня оксида азота, вызванное L-NAME, может увеличить процесс палмитирования, усилить онкогенный потенциал Ras, который включает продукцию ROS.

Исследования последних лет показали, что уменьшение концентрации внутриклеточного NO увеличивает гомеостаз железа и указывает на отрицательную корреляцию между эндогенным NO и внутриклеточным уровнем железа [Matsunaga et al., 2004]. NO вызывает супрессию прооксидантных и проапоптозных эффектов церамида, сохраняя гомеостаз внутриклеточного железа. Оксидационный стресс, вызванный церамидом, предположительно вызван активированием Rac1 [Desphande et al., 2003], который с помощью NADPHоксидаза/ROS пути регулирует большинство вызванных Ras белком клеточных эффектов, в том числе и трансформацию [Irani et al., 1997; Yang et al., 1999]. Таким образом, эндогенный NO может регулировать метильный цикл потоком железа и активированием цистатион- $\beta$ -синтазы. Необходимо отметить, что промотор гена цистатион- $\beta$ -синтазы 1b регулируется действием редокс-чувствительного Sp1 и NF- $\Upsilon$  факторов и с помощью синергичной взаимосвязи между Sp1 и Sp3 [Wilson E. M. et al. 2004]. Белки аналоги-Sp1 связаны с содержащими цинковые пальчики редокс-чувствительными белками, которые являются важными составными частями транскрипционного аппарата эукариотных клеток.

Если вызванное L-NAME истощение эндогенного NO уменьшает SAM/SAH соотношение только в V12-H-Ras доминант-позитивных клетках, можно предположить, что понижение уровня оксида азота может изменить метильный цикл с помощью увеличения продукции ROS, которая

регулируется онкогенным Ras-ом. Оксидационный стресс, прямо или с помощью редокс-чувствительных транскрипционных факторов, может изменить активность цистатион- $\beta$ -синтазы и метионинсинтазы, что и переключает пути метильного цикла с реметилирования на транссульфирования, для сохранения внутриклеточного резерва глутатиона с помощью подвергающих редокс-регуляции адаптационных процессов, которые важны для жизнеспособности клеток.

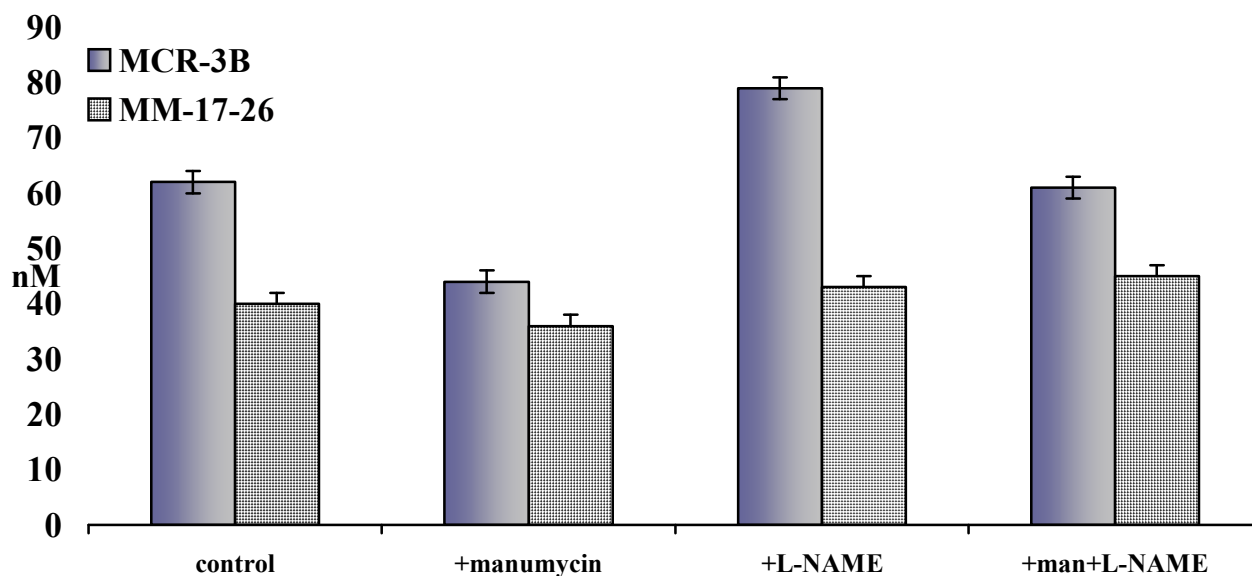
## ВЫВОДЫ

1. В условиях дефицита трофических факторов значительное влияние на изменение уровня гомоцистеина имеют посттрансляционные модификации Ras протоонкопротеина - фарнезилирование Ras белка увеличивает уровень гомоцистеина, а нитрозилирование уменьшает его продукцию.
2. Посттрансляционные модификации Ras протоонкопротеина действуют на жизнеспособность нервных клеток путём регулирования уровня гомоцистеина - в условиях дефицита трофических факторов фарнезилирование Ras белка стимулирует апоптоз, а нитрозилирование Ras белка является обязательным для сохранения жизнеспособности PC12 клеток феохромоцитомы.
3. В условиях дефицита трофических факторов Ras белок осуществляет свой эффект путем изменения ДНК-связывающей активности транскрипционных факторов - фарнезилирование и фарнезилирование Ras-белка действует на метаболизм гомоцистеина, окончательным результатом которого является изменение ДНК-связывающей активности c-Fos-фактора.
4. Активирование фарнезилированного мембранного Ras вызывает увеличение уровня SAM, в результате которого увеличивается SAM/SAH соотношение. Активирование нитрозилированного Ras вызывает уменьшение уровня SAM, увеличение уровня SAH, и снижение SAM/SAH соотношения.
5. В клетках с онкогенным *ras* геном действие посттрансляционных модификаций Ras носит противоположный характер. В условиях дефицита трофических факторов снижение конституционного уровня NO стимулирует связывание Ras-белка с мембраной, который с помощью Ras/NADPH оксидазной системы вызывает перманентный оксидационный стресс и переключает пути метильного цикла с реметилирования на транссульфирование.
6. Высказано предположение, что в нервных клетках влияние Ras белка на метаболизм гомоцистеина регулируется его посттрансляционными модификациями, которые изменяют ДНК-связывающую активность транскрипционных факторов - в случае фарнезилирования уменьшается активность c-Fos и гомоцистеин в основном включается в метильный цикл, а при нитрозилировании увеличивается активность c-Fos и активируется путь транссульфирования. Эти изменения приводят к восстановлению глутатионного резерва, что и является компенсационным механизмом выживания в условиях оксидационного стресса.

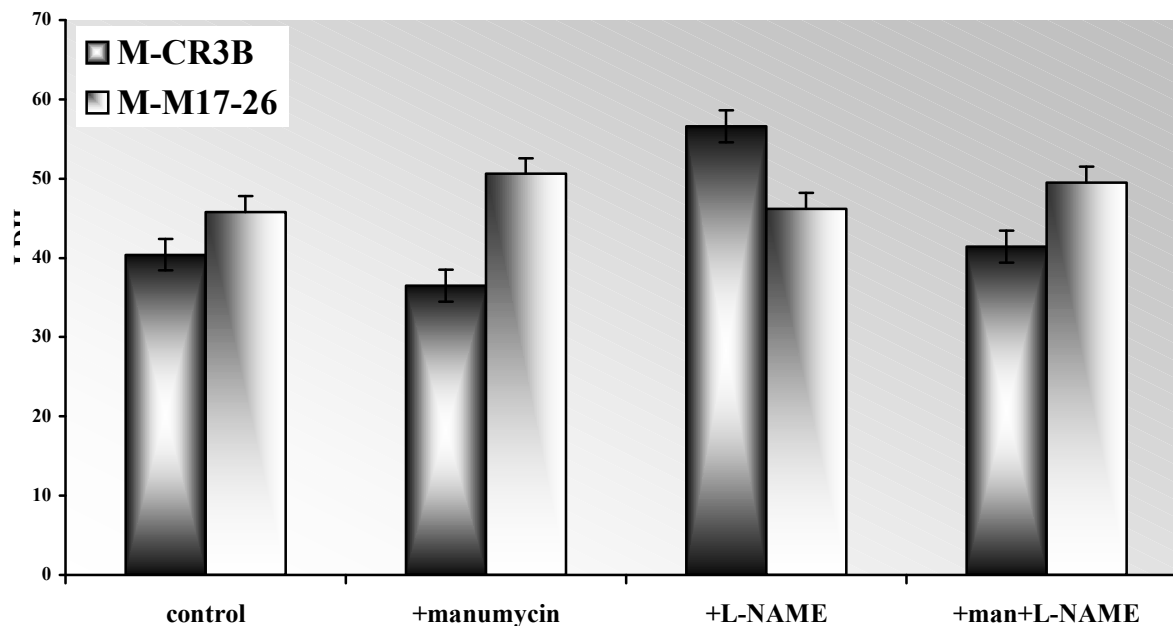
## Список научных работ опубликованных по теме диссертации

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.** *31<sup>st</sup> 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<sup>Ras</sup>.** *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<sup>Ras</sup>.** *Journal of Neurochem.* 2006,**98** (s1), 121-126.

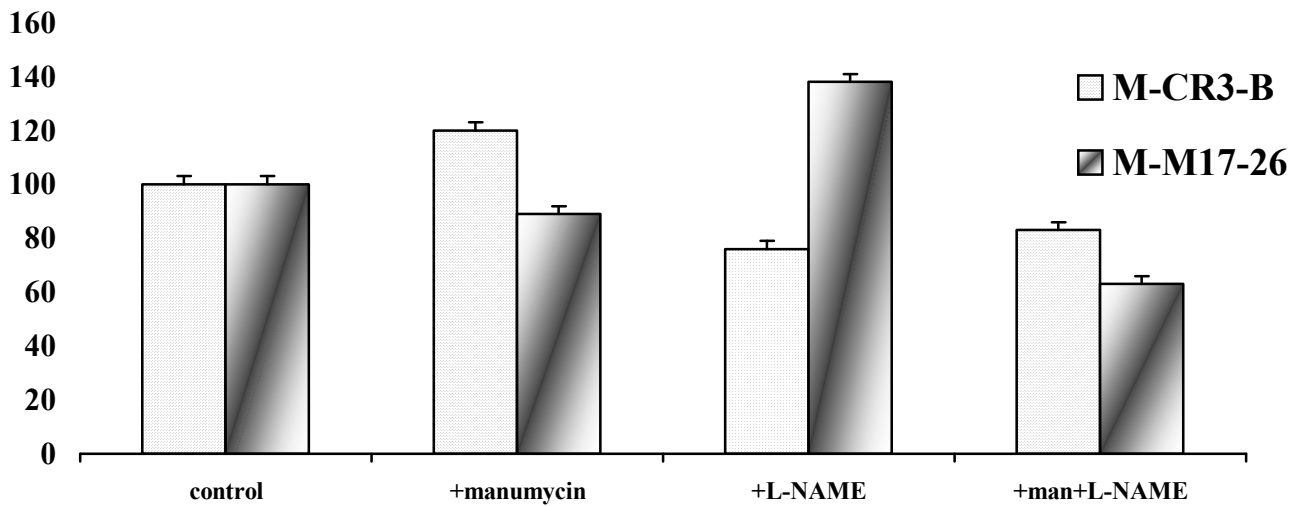
## РИСУНКИ



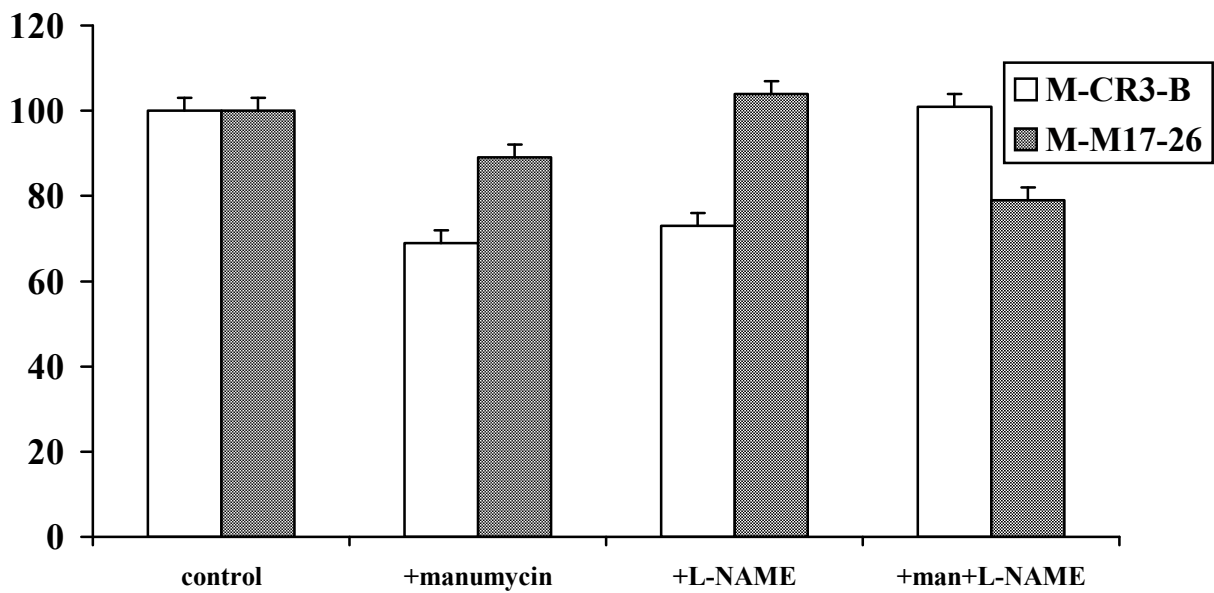
**Рисунок 1.** Продукция гомоцистеина в М-СR3В-3В и М-М17-26 клетках в результате обработки L-NAME (1mM) и манумицином(10μM) (HPLC анализ)



**Рисунок 2.** Эффект манумицина (10μM) и L-NAME (1mM) на жизнеспособность ММ17-26 и М-СR3В-3В клеток(LDH).Контролем была принята LDH активность клеточной культуры после 24 часовой инкубации в условиях дефицита трофических факторов.



**Рисунок 3.** Изменение ДНК-связывающей активности c-Fos в результате 24 часовой обработки M-M17-26 и M-CR3B клеток L-NAME (1mM) и манумицином (10µM)

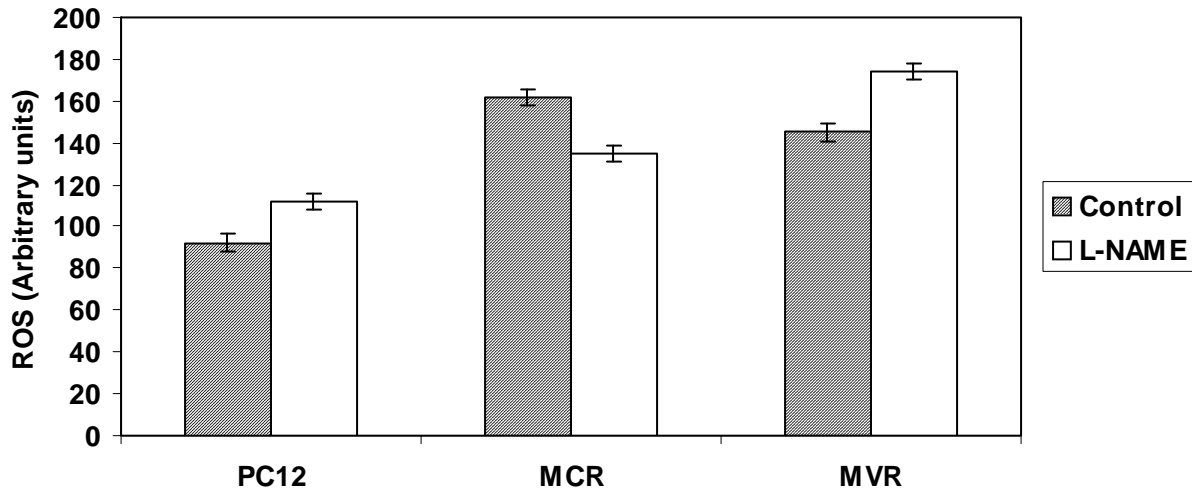


**Рисунок 4.** Изменение ДНК-связывающей активности NFκB фактора в результате 24 часовой обработки M-M17-26 и M-CR3B клеток L-NAME (1mM) и манумицином (10µM). Данные приведены в A<sub>450</sub> на мкг белка.

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
+ მანუმიცინო			
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
+ მანუმიცინო + L-NAME			
PC12	281 ± 49	237 ± 36	1.18
M-CR3B	795 ± 132*	66 ± 11*	12.0
MVR	76 ± 22*	432 ± 95*	0.19

**таблица 1.** влияние L-NAME (1mM) и манумидиноа (10μM) на уровень SAM и SAH , соотношение SAM/SAH в M-CR3B, MVR и PC-12 клетках(HPLC анализ)



**рисунок 5.** Определение продукции супероксидрадикала и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках PC12, M-CR3B и MVR методом хемилюминесценции

Схема 1. Влияние посттрансляционных модификации Ras-а на метаболизм гомоцистеина

