

საჯარო სამართლის იურიდიული პირი
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

ზურაბ რევაზის ძე ცეცხლაძე

**ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვული მატრიქსის
პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზის თვისებებისა და
ბიოლოგიური როლის შესწავლა**

03.00.03 _ მოლეკულური ბიოლოგია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი დისერტაციის

ავტორეფერატი

თბილისი
2006

**ნაშრომი შესრულებულია
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტში**

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: **თენგიზ ზაალიშვილი**,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის
წევრ-კორესპონდენტი, პროფესორი
გიორგი ზაალიშვილი
ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი

ოფიციალური ოპონენტები: **რუსუდან ახალკაცი**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი
დავით მიქელაძე,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის 20 სექტემბერს 14⁰⁰ საათზე მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტში სადისერტაციო საბჭოს (B 03 03 N2) სხდომაზე.

მისამართი: თბილისი, 0160, ლ. გოთუას ქ. №12

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტის ბიბლიოთეკაში

მისამართი: თბილისი, 0160, ლ. გოთუას ქ. №12

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2006 წლის “-----“

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი
ქიმის მეცნიერებათა კანდიდატი

ნანა ჯაფარიძე

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა. ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვებში დნმ-ის გრძელი მოლეკულების სტრუქტურულ-ფუნქციური ორგანიზაციის გარკვევა თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ ძირითად პრობლემას წარმოადგენს.

ცნობილია, რომ ბირთვში დნმ სხვა ცილოვან კომპონენტებთან ერთად წარმოდგენილია ზესპირალური, 30nm დიამეტრის მქონე ფიბრილების სახით, რომლებიც ბირთვულ მატრიქსთან პერიოდული მიმაგრებით წარმოქმნიან ყულფებს. ისინი ტოპოლოგიურად დამოუკიდებელი ერთეულებია, რომელთა ტოპოლოგია ყულფების მატრიქსთან მიმაგრების უზნებთან ასოცირებული ცილა-ფერმენტების დნმ-ტოპოიზომერაზების საშუალებით განისაზღვრება. რადგან ტოპოლოგიური გარდაქმნები უმნიშვნელოვანესია ბიოლოგიური პროცესების წარმართვისათვის დნმ-ტოპოიზომერაზები მკვლევართა ყურადღების ცენტრში იმყოფებიან (Razin S., et al., 2001).

ეუკარიოტულ უჯრედებში ბირთვული ცილების პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციები ასევე მჭიდროდ არის დაკავშირებული გენეტიკურ პროცესებთან. ერთ-ერთ ასეთ, ცილების შექცევად, პოსტრანსლაციურ მოდიფიკაციას ახორციელებს ფერმენტი პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზა (PARP), რომელიც NAD-ის მოლეკულებს გარდაქმნის (ADP-რიბოზა)_n-ში და ახდენს მათ კოვალენტურ (ან არაკოვალენტურ) გადატანას სხვადასხვა ცილებზე. პოლიმერის უარყოფითი მუხტის გამო მნიშვნელოვნად იცვლება სამიზნე ცილების ფუნქცია (de Murcia G., et al., 2004; Bürkle A., 2005).

სადისერტაციო ნაშრომი ეხება ეუკარიოტულ უჯრედებში, ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებული PARP-ის, დნმ-პოლიმერაზა β-ს და დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის თვისებების შესწავლას. ამ მიმართულებით კვლევა მნიშვნელოვანია რადგან, როგორც ბოლო წლებში დადგინდა PARP მულტიფუნქციური ფერმენტია, რომელიც არეგულირებს მთელ რიგ პროცესებს. იგი მონაწილეობს დნმ-ის რეპარაციაში, ქრომოსომების სტაბილიზაციაში, უჯრედების დიფერენციაციაში, ტრანსკრიპციის რეგულაციაში და სხვა (Oei S.L., et al., 1997; Bürkle A., 2005). PARP ჩართულია ისეთი დაავადებების პათოგენეზში როგორებიცაა: პარკინსონის და ალცჰეიმერის დაავადებები, დიაბეტი, მიოკარდიუმის ინფარქტი, ავტოიმუნური დაავადებები, ავთვისებიანი გადაგვარება და ა. შ. (Oei S.L., et al., 1997; Bürkle A., 2005). ასევე დიდ იმედებს იძლევა სხვადასხვა დაავადებების მკურნალობის თვალსაზრისით დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ზე ჩატარებული ექსპერიმენტები (Austin A., et al., 2002; Mizutani H., et al., 2002).

ნაშრომის მიზანი და ამოცანები. სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა ეუკარიოტულ უჯრედებში დნმ-ტოპოიზომერაზულ და დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე ADP_რიბოზილირების, აგრეთვე სხვადასხვა იონებისა და ახლადსინთეზირებული ნაერთების PARP-ულ აქტივობაზე გავლენის შესწავლა. აქედან გამომდინარე დასახულ იქნა შემდეგი ამოცანები:

1. შეგვესწავლა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული ლეიკოციტებისა და ვირთაგვას თავის ტვინის ნეირონების ნუკლეოიდებში, ADP-რიბოზილირების გავლენა დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის მოდულაციაში;
2. Mg²⁺-ის, Cu²⁺-ის, Zn²⁺-ის კათიონებისა და ბიოგენური პოლიამინების (სპერმინი და სპერმიდინი) როლის შესწავლა ვირთაგვას ღვიძლისა და თავის ტვინის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე;

3. X-დასახივებული ვირთაგვების თავის ტვინისაგან იზოლირებულ ბირთვებსა და ბირთვულ მატრიქსში ADP-რიბოზილირების გავლენის შესწავლა დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე;

4. ახლადსინთეზირებული ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების პოლი-ADP-რიბოზილირების რეაქციაზე ინჰიბირების უნარის შესწავლა.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. წარმოდგენილ ნაშრომში ნაჩვენებია ADP-რიბოზილირების შესაძლო მონაწილეობა ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსში ლოკალიზებული ფერმენტის, დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის მოდულაციაში, ამისი ფრაგმენტირებული დნმ-ის რელიგაციის რეაქციაზე მაინჰიბირებელი ზემოქმედების გზით. ასევე გამოკვლეულია Mg^{2+} -ის, Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის და ბიოგენური პოლიამინების გავლენა ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. გამოვლენილია ინდოლის ბირთვის შემცველი, ახლადსინთეზირებული ნაერთების მაინჰიბირებელი გავლენა PARP-ულ აქტივობაზე. მიღებულია მონაცემები, რომლებიც მიუთითებენ, რომ ADP-რიბოზილირება აძლიერებს ბირთვულ მატრიქსში დნმ-ის რეპარაციულ ბიოსინთეზს.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული ღირებულება. მიღებული შედეგები აღრმავებენ ცოდნას ბირთვული მატრიქსის, მასთან ასოცირებული PARP-ის, დნმ-პოლიმერაზა β -ს და დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის შესახებ. მიღებული შედეგები შესაძლოა გამოყენებულ იქნას სხვადასხვა დაავადებების მკურნალობის სრულყოფისათვის.

სადისერტაციო მასალების აპრობაცია. სადისერტაციო ნაშრომის შედეგები მოხსენებულ იქნა საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტის სამეცნიერო სემინარზე.

პუბლიკაციები. სადისერტაციო თემაზე გამოქვეყნებულია 4 სტატია

ნაშრომის სტრუქტურა და მოცულობა. ნაშრომი შედგება შესავალის, ლიტერატურული მიმოხილვის, კვლევის მასალისა და მეთოდების, კვლევის შედეგებისა და განხილვის, დასკვნებისა და ლიტერატურის ნუსხისაგან, რომელიც შეიცავს 105 წყაროს. სადისერტაციო ნაშრომი წარმოადგენს კომპიუტერზე ნაბეჭდ 96 გვერდს, რომელიც ილუსტრირებულია 12 სურათით და 2 ცხრილით.

ნ ა შ რ ო მ ი ს შ ი ნ ა ა რ ს ი

კვლევის მასალა და მეთოდები

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო 150-170 გრ წონის მქონე, ზრდასრული, თეთრი არახაზოვანი ვირთაგვები, რომლებიც ვივარიუმის სტანდარტულ პირობებში იმყოფებოდნენ. საკვლევ მასალად გამოყენებული იყო თავის ტვინისა და ღვიძლის ქსოვილები.

ცხოველების ტოტალურ დასხივებას ვახდენდით რენტგენის დანადგარის PVM17-ის (რუსეთი) საშუალებით, შემდეგ პირობებში: დოზის სიმძლავრე დაახლოებით 0.6 Gy /წთ, დენის ძალა 15 მა, ძაბვა 200 კვ, ფილტრები 1 მმ Al და 0.5 მმ Cu, ფოკუსური მანძილი 40 სმ. ვიყენებდით ერთჯერად დასხივებას (4.2Gy დოზით). ვირთაგვების დეკაპიტაციას ვახდენდით დასხივებიდან 1 სთ-ის შემდეგ.

თავის ტვინისა და ღვიძლის ქსოვილიდან ბირთვებს ვიღებდით მაღალი სიმკვრივის საქაროზის ხსნარში ცენტრიფუგირების საშუალებით (Chauveau J., et al., 1956; Заалишвили Т.М., и др., 1989). ბირთვული მატრიქსის პრეპარატის გამოყოფას ვწარმოებდით პანკრეასული დნმ-აზა I-ით დამუშავების შემდეგ ბირთვების მაღალი კონცენტრაციის მარილხსნარით ექსტრაქციის მეთოდის გამოყენებით (Berezney R., Bucholts L., 1981; Zaalishvili T. M., et al., 2000).

ბირთვებსა და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატებში PARP-ულ აქტივობას ვსაზღვრავდით ადენინის რგოლში ნებისმიერად მონიშნული $[^{14}C]$ NAD-ის (Заалишвили Т.М., и др., 1980), ხოლო დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას რადიოაქტიური $[^3H]$ dTTP-ის ჩართვით მქავაუხსნად პროდუქტში (Заалишвили Т.М., и др., 1989).

ჯანმრთელი დონორისაგან ახალაღებული, ჰეპარინიზირებული, ვენური სისხლისაგან მონონუკლეარულ ლეიკოციტებს ვღებულობდით ფიკოლის ხსნარში ($\rho=1.078$ გრ/მლ) ცენტრიფუგირების მეთოდის გამოყენებით (Клаус Дж., 1990)

ვირთავას თავის ტვინის ქერქიდან ნეირონებით გამდიდრებულ (90_95%) ფრაქციას ვღებულობდით ფარუქ, ნორტონისა და ჯონსონ, სელინჯერის მეთოდების გამოყენებით (Farooq M., Norton. W. 1978; Johnson D., Sellinger O. 1971).

პრეპარატების სისუფთავეს ვამოწმებდით ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპით, ხოლო უჯრედებს (მონონუკლეარულ ლეიკოციტებს და ნეირონებს) ვითვლიდით გორიაევის კამერის საშუალებით.

მაღალი მოლეკულური მასის მქონე დნმ-ის ფრაგმენტების იდენტიფიცირებისათვის ვიყენებდით ელექტროფორეზს პულსირებად ველში (CHEF-DR II, Bio-Rad). მწარმოებლის მიერ რეკომენდირებული მეთოდიკის მიხედვით.

ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ბრედფორდის მეთოდით (Bradford M., 1976), ხოლო დნმ-ის კონცენტრაციას ბარტონის მეთოდით (Burton K., 1956) და სპექტროფოტომეტრულად.

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

ADP-რიბოზილირება აძლიერებს დნმ-ის მარყუქების დახლეჩას ბირთვულ მატრიქსში ეუკარიოტული ბირთვები წარმოადგენენ რთულ სისტემებს, რომელთა არქიტექტურა წარმოდგენილია ორი ერთმანეთთან მჭიდროდ დაკავშირებული და ერთმანეთში გარდამავალი სტრუქტურის-ქრომატინისა და ბირთვული მატრიქსის-სახით. ქრომატინში შემავალი დნმ-ის მესამე დონე განისაზღვრება 30 nm-იანი ფიბრილების ჩალაგებით მარყუქებში, რომლებიც ბირთვულ მატრიქსთან პერიოდული მიმაგრებით წარმოქმნიან 5-200 kb ზომის ტოპოლოგიურად დამოუკიდებელ ერთეულებს. ტოპოლოგიური იზომერების ურთიერთგარდამქმნელი ფერმენტი-დნმ-ტოპოიზომერაზა II ასოცირებულია მარყუქების ბირთვულ მატრიქსთან მიმაგრების უბნებში. დნმ-ტოპოიზომერაზა II ATP-აზური აქტივობის ხარჯზე ახორციელებს ორჯაჭვიანი დნმ-ის გაწყვეტას, მასში ტოპოლოგიური ცვლილების შეტანას და

რელიგირებას. აქედან გამომდინარე დიდია მისი წვლილი გენეტიკური პროცესების წარმართვაში.

ბირთვული დნმ-ის რღვევას ნუკლეოსომების ზომის ფრაგმენტებად წინ უსწრებს უფრო დიდი ზომის (50–100 kb) ფრაგმენტების წარმოქმნა. ზოგიერთი ავტორის აზრით ამ ზომის დნმ-ის ფრაგმენტები წარმოიქმნებიან დნმ-ის ყულფების ჩაჭრით, მისი მატრიქსთან მიმაგრების უბნებში (Lagarkova M A., et al., 1995; Li T. K., et al., 1999) და არის დნმ-ის რღვევის ადრეული ეტაპი აპოპტოზის დროს (Oberhammer F., et al., 1993). აგრეთვე ნაჩვენებია, რომ აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მაღალი მოლეკულური მასის მქონე ფრაგმენტების წარმოქმნაში მონაწილეობას ებუღლობს დნმ-ტოპოიზომერაზა II (Austin A., et al., 2002).

როგორც აღვნიშნეთ ADP-რიბოზილირება წამოადგენს ცილების შექცევად, კოვალენტურ, პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციას, რომელიც უჯრედის ბირთვში ფერმენტ-PARP-ის საშუალებით ხორციელდება, რომლის მოლეკულების მნიშვნელოვანი ნაწილი ლოკალიზებულია ბირთვულ მატრიქსში. ნაჩვენებია, რომ ADP-რიბოზილირება ჩართულია სხვადასხვა გენეტიკურ პროცესებში: რეპლიკაცია, ტრანსკრიპცია, რეპერაცია და ა. შ (Zaalishvili T. M., et al., 2000; D'amours D., et al., 1999; Meli E., et al., 2003). ამიტომ ADP-რიბოზილირების პროცესის შესწავლა სულ უფრო დიდ მნიშვნელობას იძენს. გასუფთავებული ფერმენტის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ PARP ახდენს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის ADP-რიბოზილირებას და აინჰიბირებს მის აქტივობას (Darby M. K., et al., 1985).

ყოველივე აქედან გამომდინარე ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ADP-რიბოზილირების გავლენა დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის მოდულაციაში ადამიანის მონონუკლეარული ლეიკოციტების და ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონების ბირთვულ მატრიქსში.

მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზულ აქტივობაზე ADP-რიბოზილირების გავლენის შესაფასებლად ჩვენ ვიყენებდით ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს, რომელსაც ვღებულობდით ბოლო დროს შემუშავებული მეთოდით (Gromova I.I., et al., 1995). ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული ლეიკოციტებს და ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონებს ვსვამდით აგაროზის ბლოკებში და პერმეაბილიზირებული უჯრედების ბირთვებს ვაექსტრაგირებდით კონცენტრირებული ბუფერული მარილხსნარით, რაც განაპირობებდა არამატრიქსული დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის და PARP-ის მოშორებას და საშუალებას იძლეოდა მიგველო მატრიქსის პრეპარატი დნმ-ის ინტაქტური მარყუჟებით (ნუკლეოიდი). ვინაიდან მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II ლოკალიზებულია დნმ-ის მარყუჟების ფუძეებში, ფერმენტის აქტივობა შესაძლებელია განისაზღვროს მისი უნარით ექსპერიმენტის განსაზღვრულ პირობებში გახლიჩოს და რელიგირება გაუკეთოს დნმ-ს იმ უბნებში, რომლებითაც მარყუჟები მიმაგრებულია ბირთვულ მატრიქსზე (Razin S., 2001).

ADP-რიბოზილირების და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციების ჩასატარებლად ბლოკებს ვაინკუბირებდით 25°C-ზე 40 წთ-ის განმავლობაში ბუფერულ ხსნარში: 20 mM Tris-HCl pH~7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ და 0.1 mM EDTA, რომელიც შეიცავდა 1 mM ATP-ს. რეაქციას ვაჩერებდით ბლოკების განთავსებით სტოპ-ბუფერში: 0.4M EDTA pH~8.0, 1% SDS, პროტეინაზა K-ს თანაობისას (0,5მგ/მლ). ბლოკებს ცილების გადამუშავებისათვის ვაინკუბირებდით იმავე არეში 36 სთ-ის განმავლობაში 55 °C-ზე.

ბლოკებს ვრეცხავდით 0.2 M EDTA pH 8.0 ხსნარში და ვიყენებდით ელექტროფორეზისათვის პულსირებად ველში.

სურათ 1-ზე წარმოდგენილია მონაცემები, რომლებიც გვიჩვენებენ თუ როგორ გავლენას ახდენს ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული ლეიკოციტების ბირთვულ მატრიქსში ADP-რიბოზილირება გენომური დნმ-ის გახლეჩაზე დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით. ჩანს, რომ პულსირებად ველში დნმ-ის ელექტროფორეზული განაწილების სურათი იცვლება ნუკლეოიდების NAD-თან ინკუბაციით. NAD-ის 1 mM კონცენტრაცია იწვევს მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ის გახლეჩის გაძლიერებას. ამ დროს შეინიშნება იმ დნმ-ის რაოდენობის გაზრდა, რომელიც იმყოფება 50–500 kb არეში. ყოველივე ამას თან ახლავს დნმ-ის რაოდენობის საგრძნობი შემცირება გელის სტარტზე და კომპრესიის ზონაში. როგორც სურათიდან ჩანს PARP-ის ინჰიბიტორი, თიმიდინი 20 mM (Zaalishvili T. M., et. al 2000) გავლენას არ ახდენს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის მიერ გენომის გახლეჩაზე NAD-ის არყოფნისას და მთლიანად ხსნის NAD-ის გავლენას გახლეჩის ეტაპზე. ეს გამორიცხავს თიმიდინის და NAD-ის უშუალო ზეგავლენას დნმ-ტოპოიზომერაზულ აქტივობაზე და იმავდროულად მიუთითებს იმაზე, რომ ADP-რიბოზილირება ახდენს გავლენას ფერმენტის აქტივობაზე. ანალოგიური სურათი (სურ.2) შეინიშნება ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონებით გამდიდრებული ფრაქციის ნუკლეოიდებში. დნმ-ის რაოდენობა 50–150 kb არეში თანდათანობით იზრდება NAD-ის კონცენტრაციის გაზრდასთან ერთად (0.5–1.5 mM) და კონცენტრაციის ზრდის პარალელურად მცირდება დნმ-ის რაოდენობა გელის სტარტზე და კომპრესიის ზონაში. PARP-ის ინჰიბიტორი–თიმიდინი (20 mM) ხსნის NAD-ის ეფექტს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით დნმ-ის გახლეჩაზე. ეს კი ისევე როგორც მონონუკლეარული ლეიკოციტების შემთხვევაში მიუთითებს ADP-რიბოზილირების როლზე ბირთვული მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობაში. უნდა აღინიშნოს, რომ ასეთივე შედეგები იყო მიღებული PARP-ის სხვა ინჰიბიტორის–3-ამინობენზამიდის (4 mM) გამოყენების დროს.

როგორც ადრე აღვნიშნავდით ტოპოლოგიური იზომერიაციის დროს დნმ-ტოპოიზომერაზა II დნმ-ში წარმოქმნის დროებით ორჯაჭვიან ნახლეჩებს, რის შემდეგაც ფერმენტი არელიგირებს მოლეკულას (Razin S.V., 2001; Glazkov M.V., 1995). ჩვენს შემთხვევაში მონონუკლეარული ლეიკოციტების და ნეირონების გენომის, მაღალი მოლეკულური მასის მქონე ფრაგმენტებად დახლეჩა, ნუკლეოიდების NAD-თან ინკუბირების დროს ალბათ გამოწვეულია იმით, რომ ADP-რიბოზილირება აინჰიბირებს ტოპოიზომერაზულ რეაქციას. კერძოდ აფიქსირებს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ს იმ მომენტში როცა ის კოვალენტურად არის დაკავშირებული გაწყვეტილი, ორჯაჭვიანი დნმ-ის ბოლოებთან და აღარ ხდება დნმ-ის რელიგირება. რაც ხელს უწყობს ზემოაღნიშნული მარყუქების ზომის ფრაგმენტების ფორმირებას. ამის მიზეზი შეიძლება იყოს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის ADP-რიბოზილირება. მაგრამ არ არის გამორიცხული, რომ რაიმე სხვა ცილის (ცილების) ADP-რიბოზილირება ალოსტერულ ზეგავლენას ახდენდეს ფერმენტით დნმ-ის რელიგირების პროცესზე.

ამგვარად, ჩვენი მონაცემების საფუძველზე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ეუკარიოტულ უჯრედებში, ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებული PARP მონაწილეობს მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის რეგულაციაში. ყოველივე აქედან გამომდინარე არ არის გამორიცხული, რომ აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მაღალი

მოლეკულური მასის (50–100 kb) მქონე დნმ-ის ფრაგმენტების წარმოქმნა დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის მიერ აღნიშნული მექანიზმით ხორციელდებოდა.

Mg²⁺-ის, Cu²⁺-ის, Zn²⁺-ის კათიონების და ბიოგენური პოლიამინების ზემოქმედება ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზული აქტივობაზე.

მეტალთა იონები გავლენას ახდენენ ქრომატინის სტრუქტურაზე, ურთიერთქმედებენ რა უშუალოდ მის ცალკეულ კომპონენტებთან ან ქრომატინთან, როგორც ზემოლეკულურ სტრუქტურასთან. გარდა ამისა არსებობს შესაძლებლობა მეტალთა იონების არაპირდაპირი ზემოქმედებისა ქრომატინის სტრუქტურასა თუ ფუნქციაზე (Zbarsky I.B. 1988). მეტალთა იონების შესწავლას ეუკარიოტული გენომის სტრუქტურულ-ფუნქციურ ორგანიზაციაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს იქიდან გამომდინარე, რომ სხვადასხვა დაავადებების ფორმირება დაკავშირებულია მეტალთა ჰომეოსტაზის დარღვევასთან (Thompson K. J., et al., 2001).

მეტალთა კათიონების გარდა გარკვეულ ყურადღებას იმსახურებენ ბიოგენური პოლიამინები. ლიტერატურაში მოიპოვება მონაცემები, რომლებიც მიუთითებენ ბიოგენური პოლიამინების მონაწილეობაზე დნმ-ის რეპლიკაციაში, ტრანსკრიპციაში და ცილის სინთეზაში (Gallo C. J., et al., 1986; Blair D.G., 1985; Rodwell V.W., 1996). არ არის გამორიცხული პოლიამინების მონაწილეობა დნმ-ის მარყუჟულ ორგანიზაციაშიც (Basu H. S., et al., 1993). მეტალთა კათიონების (Mg²⁺, Cu²⁺ და Zn²⁺) და აგრეთვე პოლიამინების (სპერმინი და სპერმიდინი) ზეგავლენა მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობაზე შეუსწავლელია. ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა ბივალენტური კათიონების: Mg²⁺-ის, Cu²⁺-ის, Zn²⁺-ის და პოლიამინების: სპერმინისა და სპერმიდინის ზემოქმედება ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. ამ მიმართულებით კვლევა გამართლებულია, რადგან როგორც ირკვევა PARP მონაწილეობს სხვადასხვა გენეტიკურ პროცესებში და ჩართულია ისეთი დაავადებების პათოგენეზში, როგორცაა ავთვისებიანი გადაგვარება, დიაბეტი, პარკინსონის დაავადება და სხვა (Herceg Z., 2001).

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო ~ 150 გ. წონის ვირთაგვების ღვიძლი. იზოლირებული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობას ვსაზღვრავდით ადენინის რგოლში ნებისმიერად მონიშნული [14C] NAD-ის ჩართვით მჟავაუხსნად პროდუქტში (Заалишвили Т.М., и др., 1980). სურ.3-დან ჩანს, რომ MgCl₂ მნიშვნელოვნად აძლიერებს ღვიძლის ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობას. MgCl₂ 10 mM და 20 mM კონცენტრაციებში დაახლოებით 4,2-ჯერ ზრდის ფერმენტულ აქტივობას. არ არის გამორიცხული, რომ MgCl₂ PARP-ულ აქტივობას ასტიმულირებდეს უფრო მეტად, რაც ჩვენს შემთხვევაში ვერ აღინუსხებოდა. ამის მიზეზი კი შესაძლოა იყოს მატრიქსის პრეპარატის გამოყოფის პროცესში ისეთი ბუფერული ხსნარების გამოყენება, რომლებიც შეიცავან MgCl₂-ს, რაც ალბათ განაპირობებს Mg²⁺-ის ასოცირებას იზოლირებულ მატრიქსთან და ზრდის PARP-ულ აქტივობას საკონტროლო პრეპარატში.

რაც შეეხება ბიოგენურ პოლიამინებს (სპერმინი და სპერმიდინი), ისინი

ხასიათდებიან დამთრგუნველი ეფექტით PARP-ულ აქტივობაზე როგორც სპერმინი სურ.4 (A), ასევე სპერმიდინი სურ.4 (B) კონცენტრაციაზე დამოკიდებულებით აინჰიბირებენ ფერმენტულ აქტივობას. 1 mM კონცენტრაციით სპერმინი და სპერმიდინი PARP-ულ აქტივობას აინჰიბირებენ დაახლოებით 69% და 67%-ით შესაბამისად. ეს მონაცემები განსხვავდება ღვიძლის ბირთვულ პრეპარატზე მიღებული მონაცემებისაგან (Tanigawa Y., et al., 1977) რომლის თანახმადაც პოლიამინები ხასიათდებიან მასტიმულიზირებელი ეფექტით PARP-ულ აქტივობაზე ბირთვებში.

Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონები Mg^{2+} -ის კათიონებისაგან განსხვავებით, ხასიათდებიან დამთრგუნველი ეფექტით PARP-ულ აქტივობაზე, კონცენტრაციაზე დამოკიდებულებით. 1 mM კონცენტრაციით CuCl_2 დაახლოებით 97%-ით სურ.5 (A), ხოლო ZnCl_2 93%-ით სურ.5 (B) აინჰიბირებენ ფერმენტულ აქტივობას. CuCl_2 და ZnCl_2 გაცილებით დაბალი კონცენტრაციებითაც (10-20 μM) მნიშვნელოვნად აკავებდნენ ფერმენტულ აქტივობას. უნდა აღინიშნოს, რომ როგორც ბივალენტური კათიონები ასევე პოლიამინები იგივე ზემოქმედებას ახდენდნენ თავის ტვინის ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზეც.

Cu^{2+} -ის და Zn^{2+} -ის კათიონები ეფექტურად ურთიერთქმედებენ გოგირდმემცველ ლიგანდებთან. აქედან გამომდინარე შესაძლოა აღნიშნული კათიონები ურთიერთქმედებენ PARP-ის სულფჰიდრილის ჯგუფებთან, რაც იწვევს ფერმენტული აქტივობის დაქვეითებას.

ამგვარად მოცემული სამუშაოს შედეგები აჩვენებენ, რომ Mg^{2+} -ის, Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონები და აგრეთვე ბიოგენური პოლიამინები წარმოადგენენ ნივთიერებებს რომლებსაც გააჩნიათ ბირთვული მატრიქსის PARP-ული აქტივობის მოდულაციის შესაძლებლობა.

პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზის ეფექტური ინჰიბიტორების პროექტირება ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების საფუძველზე

PARP-ის ეფექტური ინჰიბიტორების მოძიებას, მათ სინთეზას და მოქმედების მექანიზმების შესწავლას ბოლო ხანს მეცნიერთა ძალიან დიდი ძალისხმევა ეთმობა, რადგან დადგენილ იქნა მნიშვნელოვანი ფაქტი PARP-ის მონაწილეობა მრავალი პათოლოგიის ფორმირებაში.

როგორც აღვნიშნეთ PARP მულტიფუნქციური ფერმენტია, რომელიც არეგულირებს მთელ რიგ პროცესებს. იგი მონაწილეობს დნმ-ის რეპარაციაში, ქრომოსომების სტაბილიზაციაში, უჯრედების დიფერენციაციაში, ტრანსკრიპციის რეგულაციაში და სხვ.

დნმ-ის ძლიერი დაზიანებისას (ძლიერი გენოტოქსიკური სტრესის შედეგად) ადგილი აქვს PARP-ის ჰიპერაქტივაციას, NAD-ის კონცენტრაციის სწრაფ შემცირებას, რაც იწვევს უჯრედში ATP-ის კონცენტრაციის დაქვეითებას, ენერგეტიკულ კრიზისს და უჯრედის ნეკროზს.

1979 წელს N. Berger-მა (Berger N. A., et al., 1979) გამოთქვა მოსაზრება, რომ დნმ-ის ძლიერი დაზიანებისას, PARP-ის ჰიპერაქტივაციის დროს, გენოტოქსიკურ სტრესს

უჯრედი პასუხობს თვითგანადგურების მექანიზმის ჩართვით და ილუპება მანამ, სანამ მოხდება მუტაციის დაფიქსირება.

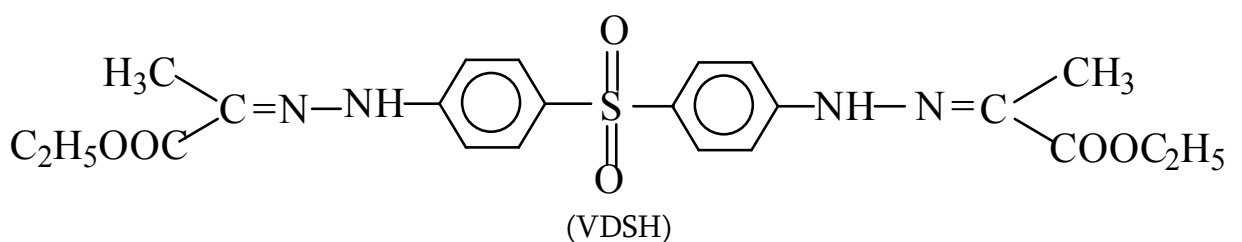
განსაკუთრებული ყურადღება მიაქციეს PARP-ს 1994 წლიდან, რადგან გაირკვა, რომ იგი აქტიურ მონაწილეობას იღებდა ნეიროტოქსინებით გამოწვეულ ნეირონების ნეკროზში. PARP-დეფიციტური თაგვების ნეირონები მდგრადი აღმოჩნდნენ ნეიროტოქსინების ზემოქმედებისადმი (Zhang J., et.al., 1994). ამჟამად დადგენილია PARP-ის მონაწილეობა სხვადასხვა დაავადებათა პათოგენეზში: ცერებრალურ, კარდიალურ, თირკმლის, ბადურის იშემიებში, ნეიროდეგენერაციულ გადაავარებებში, ალცჰეიმერისა და პარკინსონის დაავადებებში, გლავუკომის, შოკის, სხვადასხვა ანთებითი პროცესების, ართრიტის, ავტოიმუნური დაავადებების, ვირუსული ინფექციების განვითარებაში და ა. შ.

აქედან გამომდინარე მსოფლიოს წამყვან ფირმებსა და ლაბორატორიებში ინტენსიურად მიმდინარეობს PARP-ის ინჰიბიტორების სინთეზი და მათი მოქმედების მექანიზმების შესწავლა (Zhang J., 2004). მათ მოეთხოვებათ რიგი თვისებებისა, რომელთაგანაც უმთავრესია არატოქსიკურობა და ფერმენტის ძლიერი ინჰიბირების უნარი. გამოცდილ იქნა სხვადასხვა ნაერთები: მაგ. 3-ამინობენზამიდი როგორც ანტისიმსივნური პრეპარატი, ინფარქტის საწინააღმდეგოდ, იშემიისაგან დასაცავად, 5(H)-ფენანტრიდინონი რადიაციისაგან დამცავ საშუალებად, ნაფტალინამიდი კარდიალური იშემიის საწინააღმდეგოდ, ბენზოპირონი გამოცდილ იქნა ართრიტზე, ლაქტამინდოლები ანტისიმსივნურ აგენტებად და სხვ. მიმდინარეობს ამ პრეპარატების მრავალმხრივი შესწავლა, თუმცა PARP-ის როგორც თერაპიული სამიზნის რეალიზაცია ჯერ-ჯერობით მიღწეული არაა.

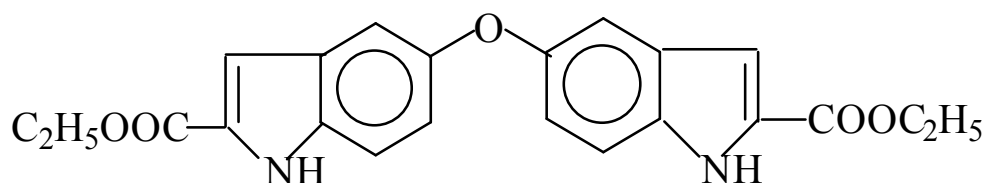
ინდოლის ბირთვის ბუნების, მისი ბიოლოგიურ სისტემებში გავრცელებისა და ამავე დროს სინთეზური შესაძლებლობების გათვალისწინებით PARP-ის ინჰიბიტორების სახით მისი ნაერთების გამოცდას საინტერესო შედეგების მიღების შესაძლებლობა უნდა მოეცა.

ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე განხორციელებულ იქნა ინდოლის ბირთვის შემცველი რამდენიმე ნაერთის სინთეზი და შევისწავლეთ მათი თვისებები.

1. პიროლდინისმჟავას ეთილისეთერის 4,4'-დიფენილენსულფონ-ჰიდრაზონის სინთეზი

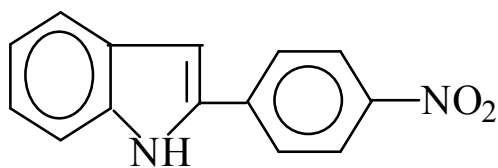


2. 2,2'-დი(ეთოქსიკარბონილ)-ბის(5-ინდოლილ) ოქსიდი



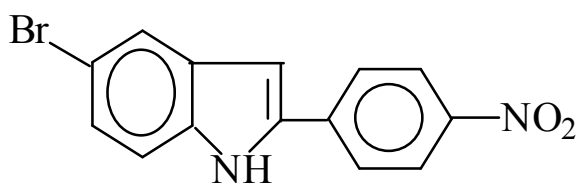
(DEIO)

3. 2(პ-ნიტროფენილ)ინდოლი



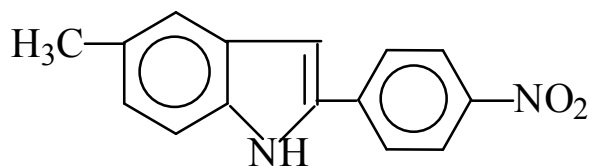
(NI)

4. 6-ბრომ-2(პ-ნიტროფენილ)ინდოლი



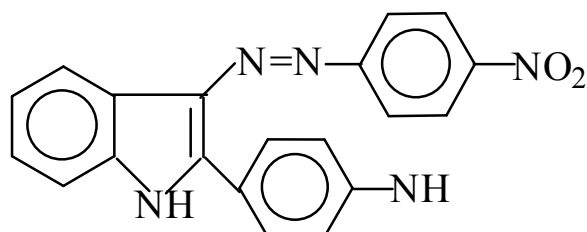
(BNI)

5. 6-მეთილ-2(პ-ნიტროფენილ)ინდოლი



(MNI)

6. 3-ნიტროფენილდიაზო-2(პ-ამინოფენილ)ინდოლი



(NDAI)

7. 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α -პირონო [3,2] ინდოლი (PI), რომლის სინთეზი განვახორციელეთ 6-ამინო- α -კუმარინის გამოყენებით **Zandmeyer**-ის ცნობილი რეაქციით, 6-ამინო- α -კუმარინის ურთიერთმოქმედებით ქლორალ-ჰიდრატთან და ჰიდროქსილამინჰიდროქლორიდთან $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ თანაობისას და მიღებული 6-

იზონიტროზოაცეტამიდო- α -კუმარინის შემდგომი ციკლიზაციით 98% გოგირდმჟავით (სურ. 6 (A) მოცემული სქემის შესაბამისად). ანალოგიურად განვახორციელეთ 5-მეთილ-2,3-დიკეტონდოლინილის (MI) სინთეზი სურ. 6 (B).

მიღებული ნაერთების PARP-ინჰიბიტორული აქტივობა შევისწავლეთ ვირთაგვების ღვიძლისა და ტვინის უჯრედებიდან გამოყოფილ ბირთვებზე. ბირთვების PARP-ულ აქტივობას ვსწავლობდით რადიოაქტიური, ადენინის რგოლში ნებისმიერად მონიშნული, [^{14}C] NAD-ის ჩართვით მჟავა უხსნად პროდუქტში. სარეაქციო არე (0,2მლ) შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl_2 , 1 mM β -მერკაპტოეთანოლს, 50% DMSO, 0,1 mM [^{14}C]NAD (6,1 mCi/mmol) და 100 μg ცილას. სინჯების ინკუბირებას ვახდენდით 25 $^{\circ}\text{C}$ -ზე 10 წთ. მიღებული ნაერთების წყალსა და სპირტში უხსნადობის ან/და შეზღუდული ხსნადობის გამო გამხსნელად ვიყენებდით DMSO-ს, რომელშიც ყველა კარგად იხსნებოდა.

ცხრილში №1 მოყვანილია ვირთაგვების ღვიძლის ბირთვების PARP-ულ აქტივობაზე ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების, ზეგავლენის მონაცემები.

როგორც მიღებული შედეგებიდან ჩანს პიროფენისმჟავას ეთილის ეთერის-4,4'-დიფენილენსულფონ-ჰიდრაზონის (VDSH) ინჰიბიტორული აქტივობა კონტროლის დონეზეა, მცირეოდენი აქტივობა (6-8 %) აღინიშნება 2(3-ნიტროფენილ)ინდოლისა (NI) და 6-მეთილ-2(3-ნიტროფენილ)ინდოლის (MNI) შემთხვევაში. 3-ნიტროფენილდიაზო-2(3-ამინოფენილ)ინდოლის (NDAI), 2,2'-დი(ეთოქსიკარბონილ)-ბის(5-ინდოლილ)ოქსიდის (DEIO) და 6-ბრომ-2(3-ნიტროფენილ)ინდოლის (BNI) PARP-ინჰიბიტორული აქტივობა დაახლოებით თანაბარია (~15%). ყველაზე მაღალი ინჰიბიტორული უნარი 5-მეთილ-2,3-დიკეტონდოლინილმა (MI) 19% (სურ.7 A) და 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- β -პირონო ინდოლმა (PI) [3,2] 59% გამოამჟღავნეს (სურ.7 B). დაახლოებით ანალოგიური შედეგები იქნა მიღებული ვირთაგვების ტვინიდან გამოყოფილ ბირთვებზეც (სურ.7 A, B).

მიღებული შედეგები ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების სტრუქტურასა და ინჰიბიტორულ აქტივობას შორის გარკვეული კორელაციის ვარაუდის შესაძლებლობას გვაძლევს. კერძოდ, მეთილის ჰიდროფობური ჯგუფების ჩანაცვლება პოლარული, წყალბადური კავშირების წარმოქმნის უნარის მქონე ჯგუფებითა და აგრეთვე ციკლური არომატული ბირთვებით ხელს უნდა უწყობდეს ფერმენტ-ინჰიბიტორის შედარებით სტაბილური კომპლექსების წარმოქმნას და აქედან გამომდინარე ნაერთის ინჰიბიტორულ აქტივობას.

ADP-რიბოზილირების გავლენა რენტგენის სხივებით დასხივებული ვირთაგვების თავის ტვინის ბირთვებისა და ბირთვული მატრიქსის ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსს მნიშვნელოვანი როლი უნდა ჰქონდეს დნმ-ის რეპლიკაციისა და ტრანსკრიპციის პროცესებში (Razin S., et al., 2001; Nickerson J., et al., 2001).

ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენებია იყო, რომ ვირთაგვებზე რენტგენის სხივებით ზემოქმედება იწვევს თავის ტვინის უჯრედების ბირთვული დნმ-პოლიმერაზა β -ს გადანაწილებას ბირთვის არამატრიქსული უბნებიდან მატრიქსში და მატრიქსთან

ასოცირებული დნმ-პოლიმერაზული აქტივობის ზრდას (Заалишвили Т.М и др.,1991). მიღებული შედეგები ლიტერატურაში არსებულ სხვა მონაცემებთან ერთად (McCready S. J., et al., 1984) მიგვანიშნებენ ბირთვული მატრიქსის მონაწილეობაზე დნმ-ის რეპარაციაში. ასევე ნაჩვენებია იყო, რომ ADP-რიბოზილირება ზრდის ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას ვირთაგვას თავის ტვინიდან იზოლირებულ ბირთვებში. 1,7 Gy დოზით დასხივებული ვირთაგვებიდან იზოლირებული ბირთვების ინკუბაცია 1 mM NAD-თან 1.5-ჯერ ზრდის დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას, მაშინ როდესაც ვირთაგვების 6,7 Gy დოზით დასხივების შემთხვევაში დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა იზრდება 4,7-ჯერ. გარდა ამისა ნაჩვენებია ვირთაგვების რენტგენის სხივებით დასხივების დროს ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებული PARP-ის აქტივობის ზრდა დასხივების დოზაზე დამოკიდებულებით (Заалишвили Т.М и др.,1989), რაც მიუთითებს მატრიქსის PARP-ის მონაწილეობაზე დნმ-ის ექსციზიურ რეპარაციაში.

ყოველივე აქედან გამომდინარე, ბირთვული მატრიქსის დონეზე მიმდინარე ADP-რიბოზილირების ექსციზიურ რეპარაციაში მონაწილეობის გამოსავლენად ჩვენს მიერ ჩატარებული იქნა შემდეგი ექსპერიმენტი: დაახლოებით 150 გრ წონის ვირთაგვების დასხივებიდან 1 სთ-ის შემდეგ ვახდენდით თავის ტვინის ბირთვების იზოლირებას და მათ ინკუბირებას NAD-თან (ADP-რიბოზილირების რეაქციის წარმართვისათვის) და დეზოქსირიბონუკლეოზიდ ტრიფოსფატებთან (რომელთაგანაც ერთ-ერთი იყო მონიშნული- $[^3\text{H}]$ -dTTP), რითაც ხორციელდებოდა დნმ-ის ბიოსინთეზი (Заалишвили Т.М и др.,1989). ამის შემდეგ ვახდენდით მატრიქსების იზოლირებას და მათში რადიოაქტიური dTMP-ის ჩართვას ვსაზღვრავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელობაში (Заалишвили Т.М и др.,1991).

ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გვიჩვენა, რომ 0,1 mM NAD-თან ბირთვების ინკუბაციის დროს 4,2 Gy დოზით დასხივებული ვირთაგვების ბირთვებში რადიოაქტიური dTMP-ის ჩართვა მჭავა-უხსნად პროდუქტში იზრდება დაახლოებით 4,4-ჯერ NAD-თან დაუინკუბირებელ ბირთვებში ჩართვასთან შედარებით სურ. 8 (A), ხოლო ბირთვულ მატრიქსში 8,8-ჯერ სურ. 8 (B). იგი შეადგენდა ბირთვებში ჩართული რადიოაქტივობის დაახლოებით 20,9%. NAD-თან დაუინკუბირებელი ბირთვების მატრიქსთან კი ასოცირებული იყო ბირთვებში ჩართული რადიოაქტივობის მხოლოდ 10,5%. უნდა აღინიშნოს, რომ ბირთვული მატრიქსები შეიცავდნენ ბირთვული ცილის 5,2% და ბირთვული დნმ-ის 2,7%. PARP-ის ინჰიბიტორი 4 mM 3-ამინობენზამიდი ხსნიდა NAD-ით გამოწვეულ ეფექტს. რაც გამორიცხავს NAD-ის უშუალო ზემოქმედებას დნმ-ის ბიოსინთეზზე და მიუთითებს ADP-რიბოზილირების როლზე ამ პროცესში. აქვე ხაზი უნდა გაესვას იმ გარემოებას, რომ დნმ-პოლიმერაზა α -ს ინჰიბიტორი აფიდიკოლინი გავლენას არ ახდენდა $[^3\text{H}]$ dTMP-ის ჩართვაზე მჭავაუხსნად პროდუქტში, რაც დნმ-ის რეპარაციაში უშუალოდ დნმ-პოლიმერაზა β -ს მონაწილეობაზე მიუთითებს.

ვინაიდან ცნობილია, რომ ქრომატინი განიცდის სტრუქტურულ ცვლილებას დნმ-ის იმ უბნებში სადაც მიმდინარეობს ექსციზიური რეპარაცია (Hunting D. I., et al., 1985) ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემები მიუთითებენ იმაზე, რომ ალბათ დასხივების შემდეგ PARP-ის გააქტივება იწვევს მატრიქსთან ასოცირებული ქრომატინის კონფორმაციულ ცვლილებას, რაც აადვილებს დნმ-პოლიმერაზის გადაადგილებას დნმ-მატრიცაზე და შესაბამისად განაპირობებს დნმ-ის ბიოსინთეზის გაძლიერებას.

დასკვნები

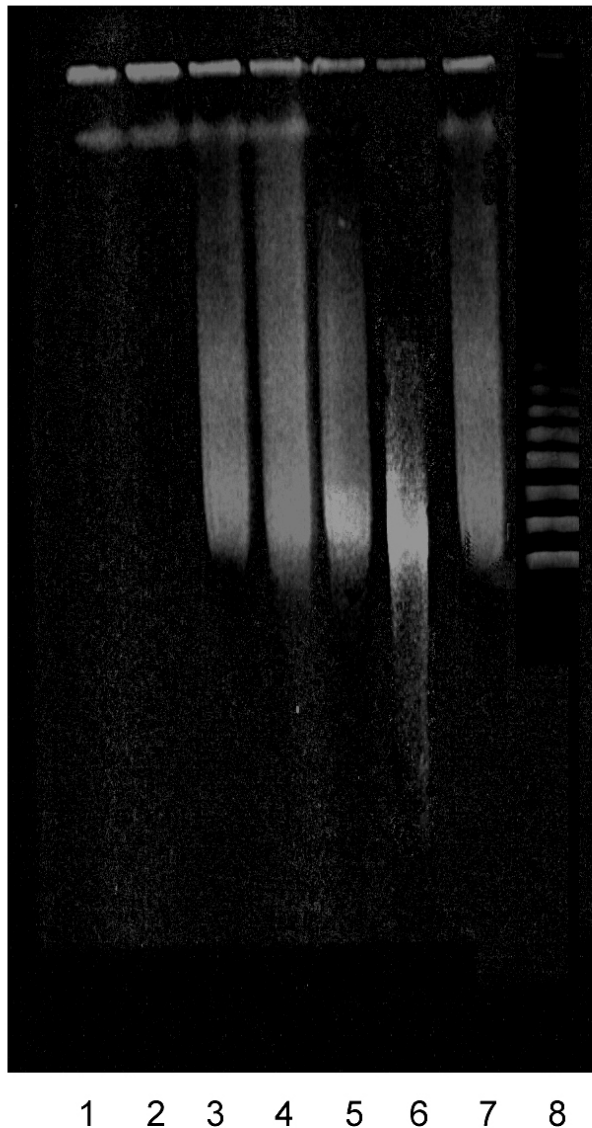
1. პულს-ელექტროფორეზის მეთოდის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსში ADP-რიბოზილირებით ცილების პოსტრანსლაციურ მოდიფიკაციას შესაძლოა მარეგულირებელი ზემოქმედება ჰქონდეს დნმ-ის ტოპოლოგიის განმსაზღვრელი ფერმენტის, დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობაზე. კერძოდ, გამოვლენილია ADP-რიბოზილირების შესაძლო მონაწილეობა ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსში ლოკალიზებული ფერმენტის, დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის მოდულაციაში, მისი ფრაგმენტირებული დნმ-ის რელიგაციის რეაქციაზე მაინჰიბირებელი ზემოქმედების გზით.
2. დადგენილია, რომ Mg^{2+} -ის კათიონები ასტიმულირებენ ღვიძლისა და თავის ტვინის ბირთვული მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობას მაშინ, როდესაც Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონები და აგრეთვე ბიოგენური პოლიამინები (სპერმინი და სპერმიდინი) Mg^{2+} -ის კათიონების თანაობისას მნიშვნელოვნად თრგუნავენ პოლიმერაზულ აქტივობას.
3. სინთეზირებულია პოლი-ADP-რიბოზილირების რეაქციის ინჰიბირების უნარის მქონე ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთები – 5-მეთილ-2,3-დიკეტონდოლინილი (MI) და 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α -პირონო ინდოლი (PI), რომლთა საფუძველზეც მომავალში შესაძლოა უფრო მაღალეფექტური ინჰიბიტორული ბუნების მქონე ნაერთების დიზაინი.
4. ADP-რიბოზილირება აძლიერებს რენტგენის სხივებით დასხივებული ვირთაგვებიდან იზოლირებულ ბირთვებში ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას და განსაკუთრებით მკვეთრად ზრდის მას ბირთვულ მატრიქსში, რაც მიუთითებს ADP-რიბოზილირების მნიშვნელობაზე ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებულ დნმ-ის ექსციზიურ რეპარაციაში.



სურ.1. ADP-რიბოზილირების გავლენა ადამიანის მონონუკლეარული ლეიკოციტების ბირთვული მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით გენომური დნმ-ის გახლეჩაზე. აგაროზის გელის პულსელექტროფორეგრამა. 1-ნუკლეოიდების დნმ; 2-4-ნუკლეოიდების დნმ ინკუბირებული 40 წთ-ის განმავლობაში 25°C-ზე ბუფერში PARP-ული და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციების ჩასატარებლად (2), 20 mM თიმიდინის (3), 1 mM NAD-ის (4) და 1 mM NAD და 20 mM თიმიდინის (5) თანაობისას; 6-λ ფაგის კონკატემერიზებული დნმ (48,5 , 97 , 145,5 . . . kb).

Fig.1. Effect of ADP-ribosylation on genomic DNA cleavage by topoisomerase II associated with the nuclear matrix in human mononuclear leukocytes. Pulsed-field electrophoresis in agarose gel was used to resolve DNAs of (1) untreated nucleoids and (2-4) nucleoids incubated in the buffer for the PARP and topoisomerase reactions at 25°C for 40 min in the (2) absence or

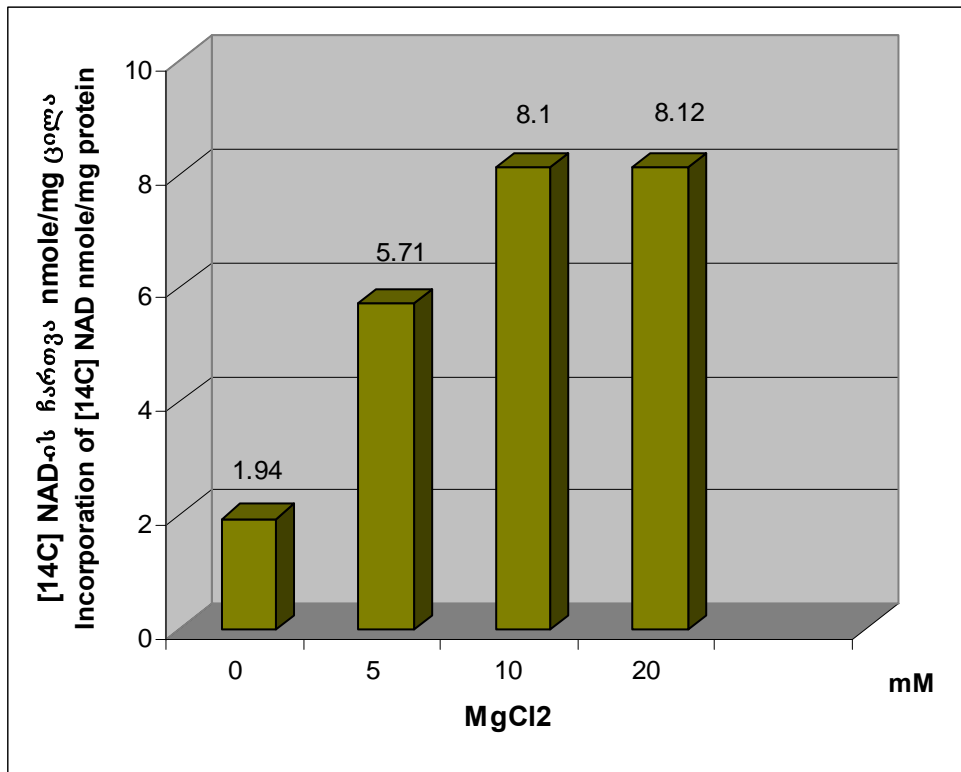
presence of (3) 20 mM thymidine, (4) 1 mM NAD, or (5) 20 mM thymidine and 1 mM NAD. Lane 6, concatenated DNA of phage λ (48.5, 97.0, 145.5, ... kb).



სურ.2. ADP-რიბოზილირების გავლენა ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონების ბირთვული მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით გენომური დნმ-ის გახლეჩაზე. აგაროზის გელის პულსელექტროფორეგრამა. 1-ლიზირებული უჯრედების დნმ სტოპ-ბუფერში. 2-ნუკლეოიდების დნმ; 3-7-ნუკლეოიდების დნმ დაინკუბირებული 40 წთ 25 °C-ზე ბუფერში PARP-ული და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციების ჩასატარებლად, NAD-ის თანაობისას კონცენტრაციებით 0 , 0,5 , 1 , 1,5 mM (3-6); 1,5 mM NAD და 20 mM თიმიდინის (7); 8- λ ფაგის კონკატემერიზებული დნმ (48,5 , 97 , 145,5 . . . kb).

Fig.2. Effect of ADP-ribosylation on genomic DNA cleavage by topoisomerase II associated with the nuclear matrix in rat brain neurons. Pulsed-field electrophoresis in agarose gel was used to resolve DNAs of (1) cells lysed in the stop buffer; (2) nontreated nucleoids; and (3-7) nucleoids incubated in the buffer for the PARP and topoisomerase reactions at 25°C for 40 min in the (3)

absence or presence of (4) 0.5, (5) 1.0, or (6) 1.5 mM NAD or (7) 1.5 mM NAD and 20 mM thymidine. Lane 8, concatenated DNA of phage λ (48.5, 97.0, 145.5, ...kb).



სურ.3. MgCl₂-ის გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინტილაციურ მთვლელებზე.

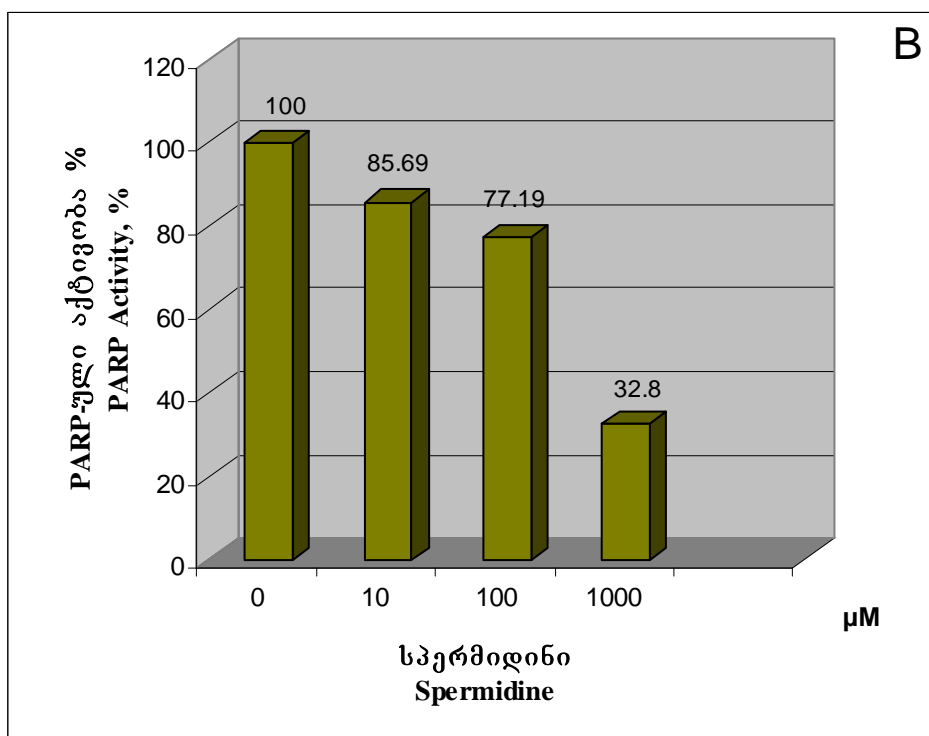
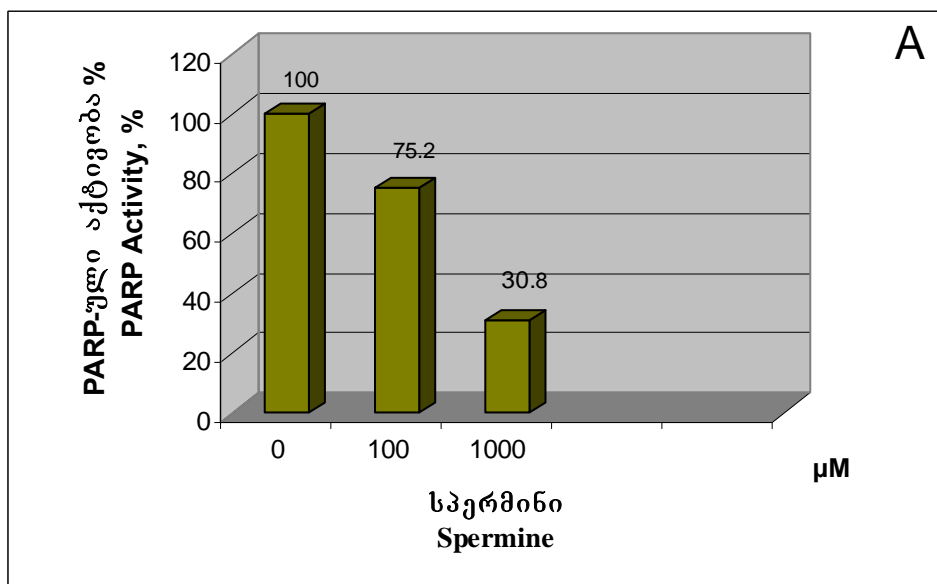
Fig.3. Effect of MgCl₂ in PARP activity of the nuclear matrix of rat liver cells. Reaction was carried out for 10 min at 25°C, in 0.2ml of incubation medium containing 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 0.1mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) and the preparation of the nuclear matrix (100 µg protein). Radioactivity was measured by liquid scintillation counter.

ცხრილი 1. ზოგიერთი ახლადსინთეზირებული, ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთის მაინჰიბირებელი გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის ბირთვულ PARP-ულ აქტივობაზე.

Table 1. Influence of some newly synthesized indole cycle containing compounds on the rat liver nuclear PARP activity.

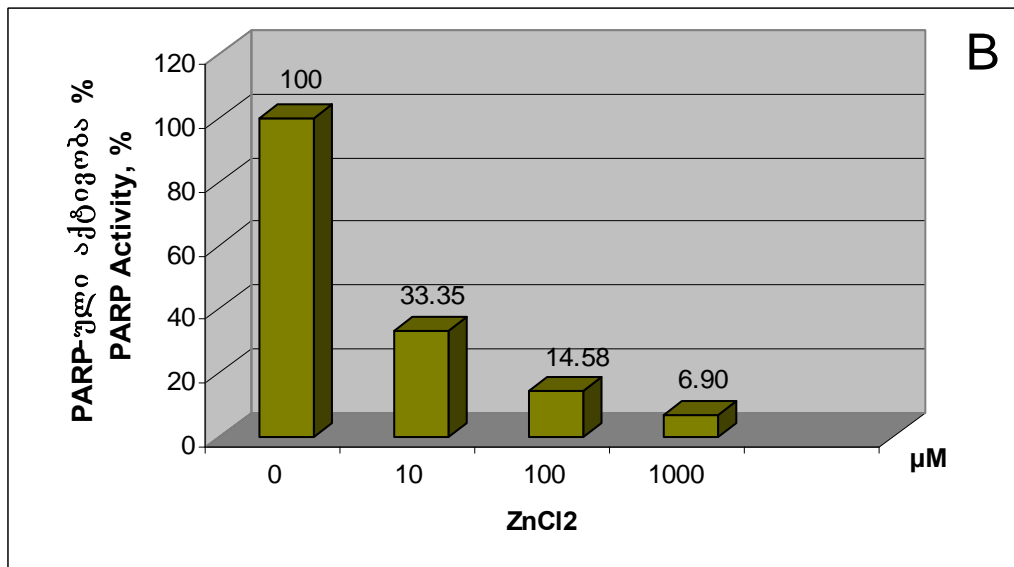
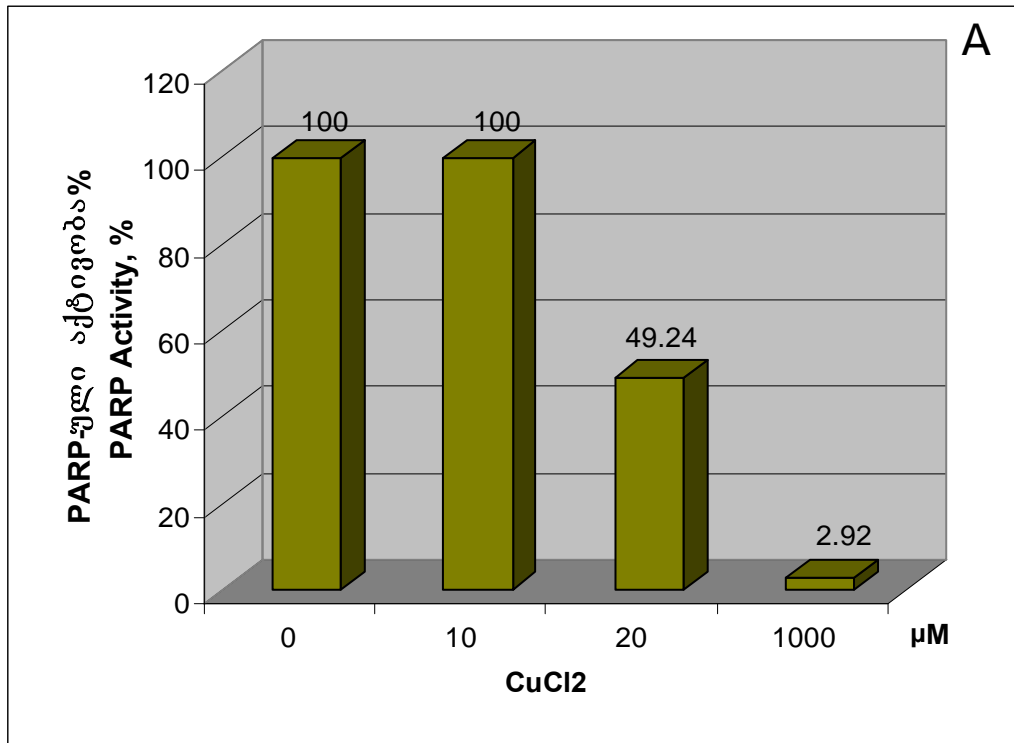
ნაერთები Compounds	[¹⁴ C] NAD-ის ჩართვა მჟავა უხსნად პროდუქტში Incorporation of [¹⁴ C] NAD into acid-insoluble product
-----------------------	--

(2mM)	nmole/მგ ცილა nmole/mg protein	%
0	5,39	100
VDSH	5,39	100
DEIO	4,95	85,26
NI	5,08	94,35
BNI	4,05	85,14
MNI	5,48	92,80
NDAI	4,92	83,40



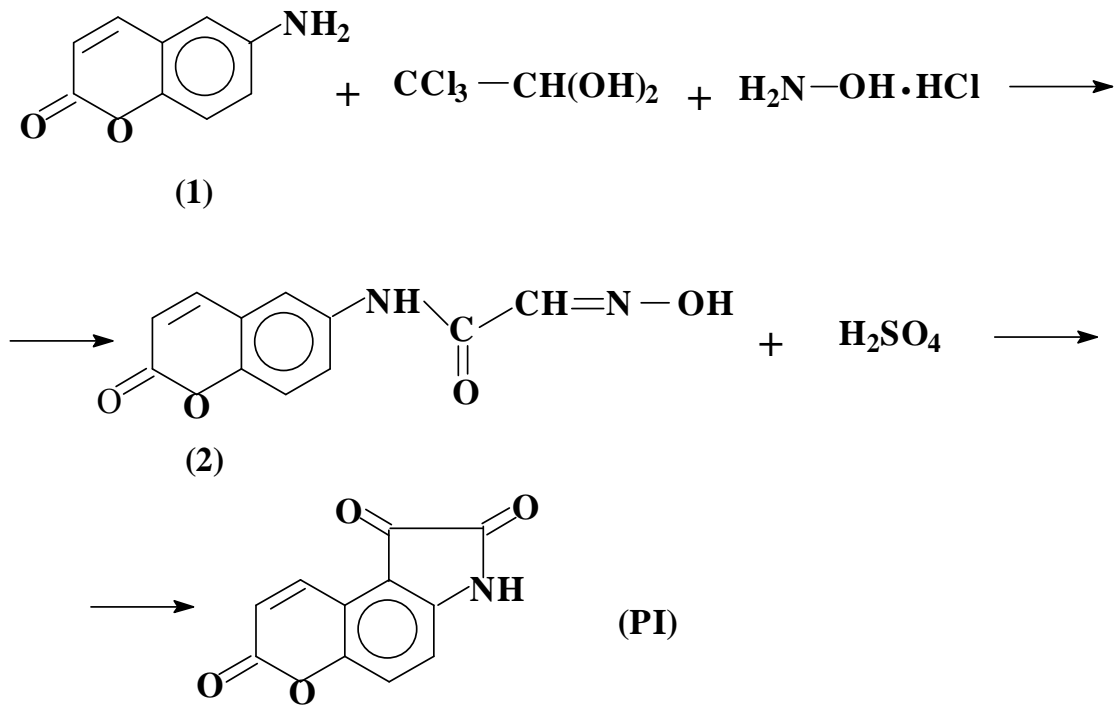
სურ.4. სპერმინის (A) და სპერმიდინის (B) გავლენა, ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინტილაციურ მთვლელებზე.

Fig.4. Effect of spermine (A) and spermidine (B) in PARP activity of the nuclear matrix of rat liver cells. Reaction was carried out for 10 min at 25°C in 0.2ml of incubation medium containing 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 0.1mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) and the preparation of the nuclear matrix (100 µg protein). Radioactivity was measured by liquid scintillation counter.

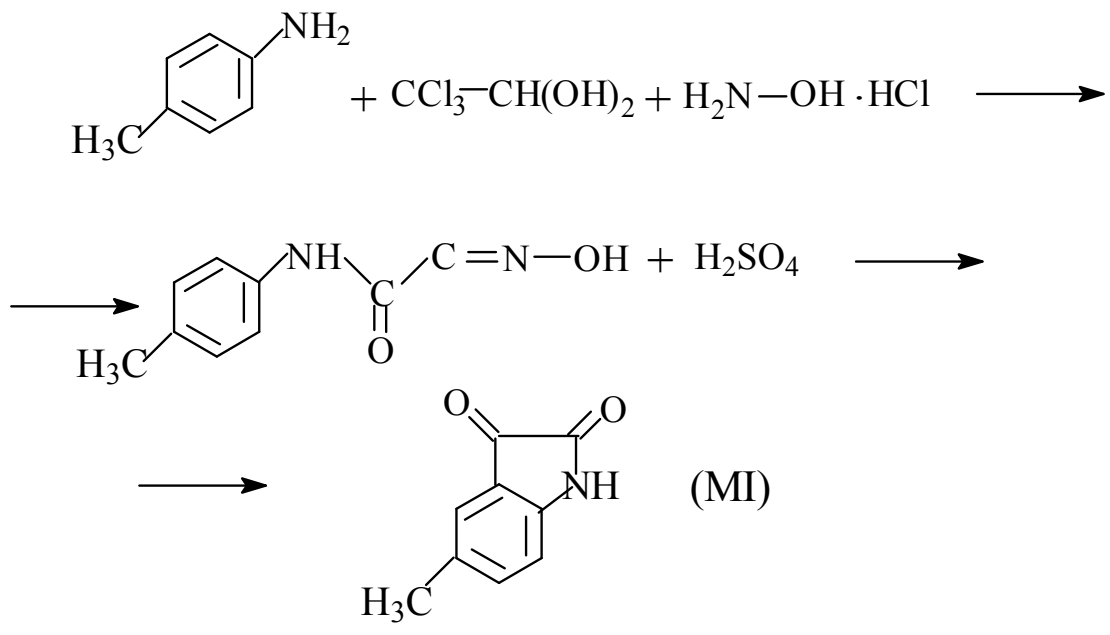


სურ.5. CuCl_2 -ის (A) და ZnCl_2 -ის (B) გავლენა, ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25°C -ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM HEPES-NaOH pH~8.0, 20 mM MgCl_2 , 0.1 mM $[^{14}\text{C}] \text{NAD}$ (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელზე.

Fig.5. Effect of CuCl_2 (A) and ZnCl_2 (B) in PARP activity of the nuclear matrix of rat liver cells. Reaction carried out for 10 min at 25°C , in 0.2ml of incubation medium containing 50 mM HEPES-NaOH pH~8.0, 20 mM MgCl_2 , 0.1mM $[^{14}\text{C}] \text{NAD}$ (6.1 mCi/mm) and the preparation of the nuclear matrix (100 mkg protein). Radioactivity was measured by liquid scintillation counter.

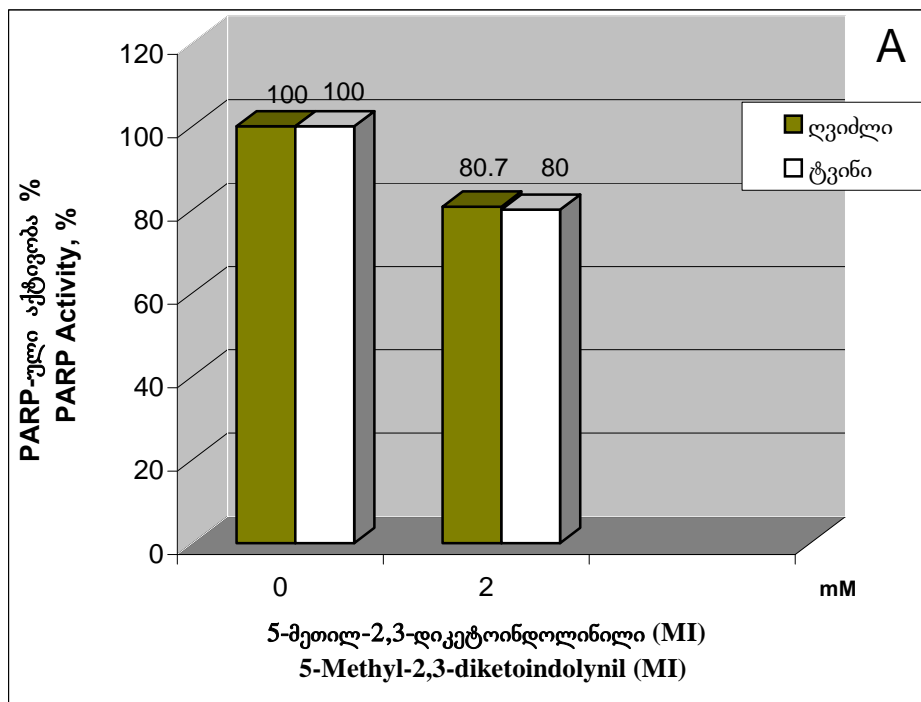


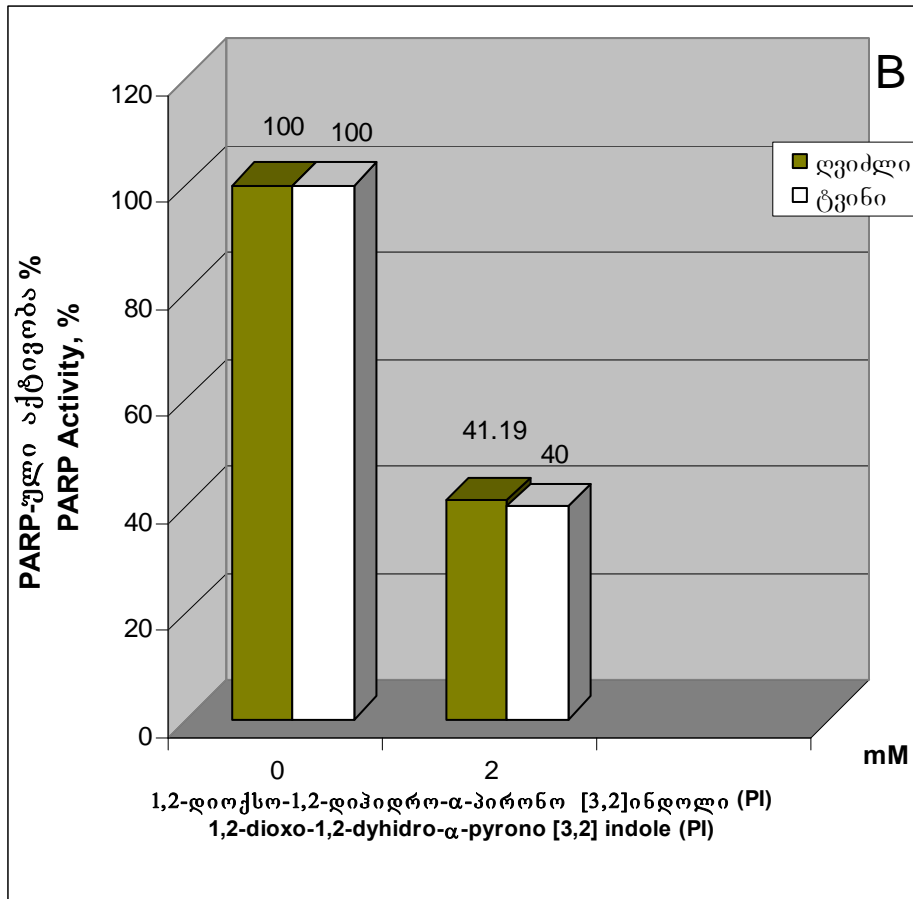
A



სურ.6. (A) 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α -პირონო [3,2] ინდოლის (PI) და (B) 5-მეთილ-2,3-დიკეტოინდოლინის (MI) სინთეზი. Zandmeyer-ის ცნობილი რეაქცია.

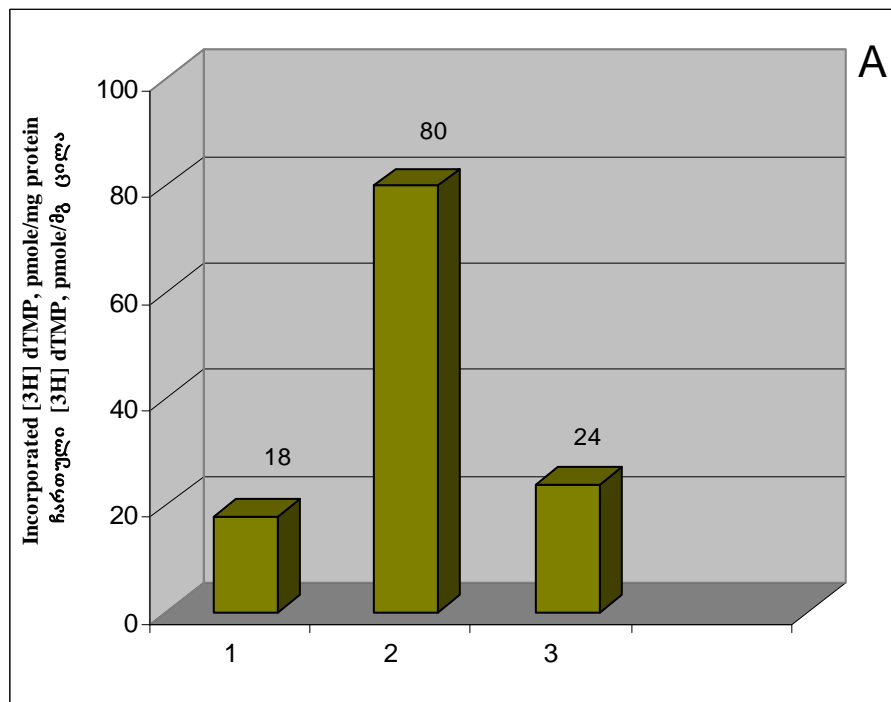
Fig.6. The synthesis of 1,2-dioxo-1,2-dyhydro- α -pyrono[3,2] indole (PI) (A) and 5-methyl-2,3-diketoindolynil (MI) (B). Zandmeyer's classic reaction.

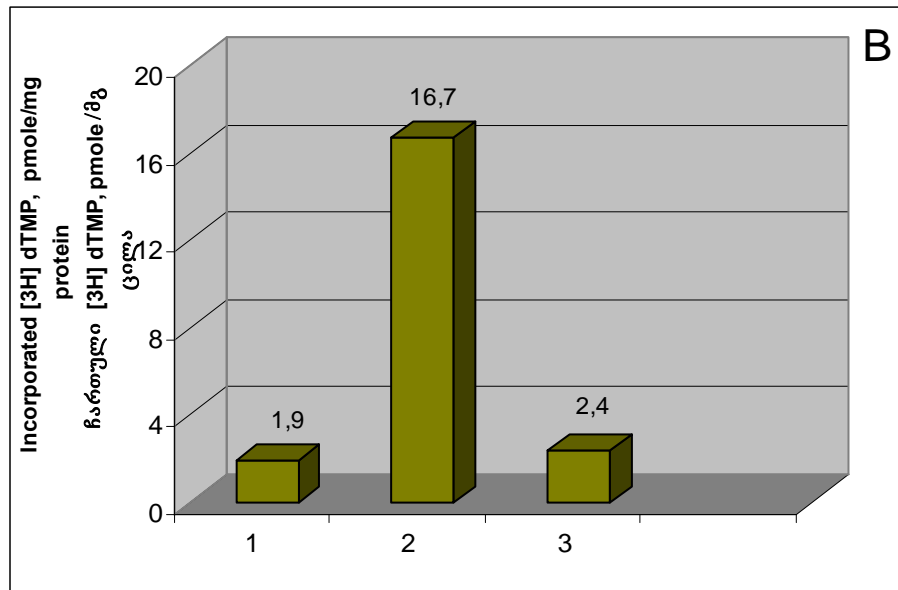




სურ.7. ახლადსინთეზირებული ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების: (A) 5-მეთილ-2,3-დიკეტოინდოლინილის (MI) და (B) 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α -პირონო [3,2] ინდოლის (PI) გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის და თავის ტვინის ბირთვულ პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

Fig.7. Influence of newly synthesized indole cycle containing compounds: 5-methyl-2,3-diketoindolynil (MI) (A) and 1,2-dioxo-1,2-dihydro- α -pyrnono[3,2] indole (PI) (B) on the rat liver and brain cell nuclear matrix poly(ADP-ribose) polymerase activity.





სურ.8. X-დასხივებულ ვირთაგვებში ADP-რიბოზილირების გავლენა თავის ტვინის ბირთვულ (A) და ბირთვული მატრიქსის (B) დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

1. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა;
2. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა 0.1 mM NAD-ის თანაობისას;
3. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა 0.1 mM NAD-ის და 4 mM 3-ამინობენზამიდის თანაობისას.

რეაქციას ვატარებდით 37°C-ზე 30 წთ არეში (3 მლ): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-მერკაპტოეთანოლი, 0.1 mM dATP, dGTP, dCTP, [³H] dTTP (2 Ci/mmole) და ბირთვები (3 mg ცილა).

Fig.8. Influence of ADP-ribosylation on the brain nuclear and nuclear matrix DNA-polymerase activity of X-irradiated rats.

1. DNA-polymerase activity.
2. DNA-polymerase activity in presence of 0.1mM NAD.
3. DNA-polymerase activity in presence of 0.1mM NAD and 4 mM 3-aminobenzamide.

The reaction was carried out for 30 min at 37°C (3 ml) in the medium: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM dATP, dGTP, dCTP, [³H]dTTP (2 Ci/mmole) and nuclei (3 mg protein).

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულ ნაშრომთა სია

The list of publications related to the thesis

1. G. Zaalishvili., N. Japaridze., K. Kolkhidashvili., K. Kutalia., D. Margiani., Z. Tsetskhladze., T. Zaalishvili., Influence of Mg²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ Cations and Biogenic Polyamines on the Nuclear Matrix Poly(ADP-ribose) Polimerase Activity in the Rat Liver Cells, *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences*, Vol. 170, №1, 2004, pp.169-171.

2. G.T. Zaalishvili., **Z.R. Tsetskhladze.**, D.O. Margiani., I. Yu. Gabriadze., M. Chelidze., T. Zaalishvili. Modulation of the DNA-topoisomerase II Activity by ADP-ribosylation in the Nuclear Matrix of Eukaryotic Cells, *Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. B, Vol. 2, No. 5-6, 2004, pp.79-83.*
3. G.T. Zaalishvili., **Z.R. Tsetskhladze.**, D.O. Margiani., I. Yu. Gabriadze., T. M. Zaalishvili., ADP-ribosylation Intensifies Cleavage of DNA Loops in the Nuclear Matrix, *Molecular Biology* (Moscow), Vol. 39, No.2, 2005, pp.317-320.
4. T. Zaalishvili., D. Kharadze., T. Khoshtaria., N. Arabuli., K. Kolkhidashvili., K. Kutalia., T. Omiadze., L. Kirmelashvili., L. Edilashvili., G. Zaalishvili., **Z. Tsetskhladze.**, Design of Indole Derivatives and Studying their Inhibitory Ability of Poly(ADP-ribosylation) Reaction, *Bulletin of the Georgian Academy of Sciences, Vol. 172, №2, 2005, pp.314-316.*

ტირაჟი 60 ეგზემპ.
დაბეჭდილია ციფრულ პოლიგრაფიულ
ცენტრ შპს "ბენე"-ში
გამსახურდიას გამზ. 3
ტელ.: 38 25 23