

Ras ცილის ნიტროზილირების მნიშვნელობა

ჰიპოქსიურ პროცესებში

გალინა გოლოშვილი

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო
უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და მედიცინის
ფაკულტეტზე ბიოქიმიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების
მოთხოვნების შესაბამისად*

ბიოქიმიის და მოლეკულური ბიოტექნოლოგიის სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: თამარ ბარბაქაძე, ასოცირებული პროფესორი, დოქტორი
ბიოლოგიაში

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2022

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის „Ras ცილის ნიტროზილირების მნიშვნელობა ჰიპოქსიურ პროცესებში“ ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

გალინა გოლოშვილი

თარიღი 14.03.2022

აბსტრაქტი

ჰიპოქსიამ ან ჭარბი რეაქტიული ჟანგბადის და აზოტის სახეობების ზემოქმედებამ, შესაძლოა გამოიწვიოს სხვადასხვა სამიზნე ცილების, მათ შორის Ras-სუპეროჯახის GTP-აზების მოდიფიცირება S-ნიტროზილირებით. ჰიპოქსიის პირობებში Ras ცილა გადაადგილდება ციტოზოლში და ურთიერთქმედებს გოლჯის აპარატთან, ენდოპლაზმურ რეტიკულუმთან, მიტოქონდრიასთან. Ras-ის მობილობა/ტრანსლოკაცია დამოკიდებულია უჯრედების ჟანგვით სტატუსზე. Ras-GTP-აზები უჯრედში არეგულირებენ მრავალ ცენტრალურ სასიგნალო გზას. ჰიპოქსია იწვევს ნიტროზულ/ოქსიდაციურ სტრესს და არღვევს Ras-დამოკიდებულ დაღმავალ პროცესებს. H-Ras-ს გააჩნია ცისტეინის ორი ნაშთი (C181, C184) C-ტერმინალურ უბანში, რომლებიც განიცდიან მოდიფიცირებას პალმიტირებით ერთხელ ან ორჯერ. პალმიტირება ხელს უწყობს პლაზმურ მემბრანაში მის სტაბილურ მდებარეობას. ჩვენ ვვარაუდობთ, რომ ჰიპოქსიის შედეგად წარმოქმნილი აზოტის ოქსიდის მაღალ კონცენტრაციას შეუძლია გამოიწვიოს ტერმინალური ცისტეინის S-ნიტროზილირება, რასაც მოსდევს დეპალმიტირება და H-Ras-ის გადაადგილება. ჩვენს ექსპერიმენტულ კვლევაში განვსაზღვრეთ ნიტროზილირებული H-Ras-ის (NO-H-Ras) დონე ჰიპოქსიურ და ნორმოქსიურ პირობებში მემბრანულ და ციტოპლაზმურ ფრაქციებში დიფერენცირებულ (D) და არადიფერენცირებულ (ND) ფოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში, აზოტის ოქსიდის დონორით, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდით (SNP) დამუშავებისას და მის გარეშე. Ras ცილის კვლევა განხორციელდა S-ნიტროზილირების კიტით, იმუნოპრეციპიტაციით და ვესტერნ ბლოტინგის ანალიზით. NO-H-Ras-ის მოქმედება იზოლირებული მიტოქონდრიების ჟანგვით მეტაბოლიზმზე შევისწავლეთ მიტოქონდრიების მიერ სკოპოლექტინის დაჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგის რაოდენობის შეფასებით და ატფ-ის წარმოქმნა

ლუმინომეტრიული მეთოდის გამოყენებით. ექსპერიმენტების მეორე სერიაში, შევსიწავლეთ 100 μ M აზოტის ოქსიდის დონორის (S-ნიტროპრუსიდის) და 100 μ M პალმიტირების ინჰიბიტორის (2-ბრომპალმიტატი) ზეგავლენა მემბრანა-დაკავშირებული NO-H-Ras-ის და პალმიტირებული-H-Ras-ის (palm-H-Ras) გადანაწილებაზე ჰიპოქსია/ნორმოქსიული პირობების დროს, დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

კვლევის შედეგად დადგინდა, რომ ჰიპოქსიამ არ მოახდინა გავლენა ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირებაზე ND PC-12 უჯრედებში. ჰიპოქსიურ პირობებში, ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირება მნიშვნელოვნად შემცირდა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში. SNP-მა არ შეცვალა ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირების დონე არც ჰიპოქსიურ და არც ნორმოქსიურ პირობებში. მეორეს მხრივ, ჰიპოქსიამ არ შეცვალა მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირება დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში. მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის SNP-დამოკიდებული ნიტროზილირება მნიშვნელოვნად გაიზარდა დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში. ორივე, არამოდიფიცირებულმა ნორმალურმა, ასევე მუტანტურმა H-Ras-მა გააძლიერა ATP-ის მიტოქონდრიული სინთეზი, ხოლო H-Ras-ის S-ნიტროზილირების შედეგად ATP-ის სინთეზის მასტიმულირებელი ეფექტი აღარ აღინიშნებოდა. ასევე, ნორმოქსიულ პირობებში, S-ნიტროპრუსიდი ზრდის მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირებას, მხოლოდ დიფერენცირებულ უჯრედებში, ხოლო ჰიპოქსიურ პირობებში S-ნიტროპრუსიდი ახდენს H-Ras-ის ნიტროზილირების სტიმულაციას, როგორც დიფერენცირებულ, ასევე არადიფერენცირებულ უჯრედებში. ჰიპოქსიურ პირობებში S-ნიტროპრუსიდი მნიშვნელოვნად ამცირებს H-Ras-ის პალმიტირების დონეს, როგორც დიფერენცირებულ, ასევე არადიფერენცირებულ უჯრედებში. ხოლო ნორმოქსიულ პირობებში მისი როლი ნაკლებად მნიშვნელოვანია. გარდა ამისა, ვესტერნ ბლოტის ანალიზმა აჩვენა, რომ S-ნიტროპრუსიდი ჰიპოქსიურ პირობებში

მკვეთრად ამცირებს ERK ფოსფორილირებას და პარალელურად ზრდის ჰიპოქსიით ინდუცირებული ფაქტორის აქტივობას და უჯრედშიდა სუქცინატის კონცენტრაციას. ჩვენ ვვარაუდობთ, რომ ჰიპოქსიას შეუძლია შეამციროს ციტოპლაზმური-H-Ras-ის S-ნიტროზილირება დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში და დათრგუნოს მიტოქონდრიულ ჟანგვით მეტაბოლიზმზე NO-H Ras-ის ინჰიბიტორული ეფექტი. ჰიპოქსიის შედეგად წარმოქმნილი აზოტის ოქსიდის მაღალ კონცენტრაციას, შეუძლია მოახდინოს ტერმინალური ცისტეინის ნაშთების ნიტროზილირება, რაც თავის მხრივ იწვევს H-Ras-ის აქტივობის რეგულაციის მოშლას და ცვლის უჯრედის პასუხს ჰიპოქსიაზე.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: H-Ras, PC-12, Ras-GTP-აზები, პალმიტირება, S-ნიტროზილირება, ჰიპოქსია, სუქცინატი, აზოტის ოქსიდი, მიტოქონდრია, ატფ.

Abstract

Hypoxia or exposure to excessive reactive oxygen or nitrogen species could induce S-nitrosylation of various target proteins, including GTPases of the Ras-superfamily. Under hypoxic conditions, the Ras-protein is translocated to the cytosol and interacts with the Golgi complex, endoplasmic reticulum, mitochondria. The mobility/translocation of Ras depend on the cells oxidative status. Ras-GTPases regulate a lot of central signaling pathways in the cell. Hypoxia induces nitrosative/oxidative stress and dysregulates Ras-dependent down-stream processes. H-Ras possesses two cysteine residues (C181, C184) in the C-termini, which are palmitoylated once or twice. Palmitoylation is sufficient for promoting stable plasma membrane localization. We hypothesized that hypoxia-formed nitric oxide high concentration could induce terminal-cysteines S-nitrosylation, followed by depalmitoylation and H-Ras mislocalization.

We analyzed NO-H-Ras levels under hypoxic/normoxic conditions in membrane and soluble fractions of ND and D PC12 cells with/without nitric oxide donor, sodium nitroprusside (SNP) treatment. Cells were analyzed by the S-nitrosylated kit, immunoprecipitation, and Western blot. We assessed the action of NO-H-Ras on oxidative metabolism of isolated mitochondria by determining mitochondrial hydrogen peroxide generation via the scopoletin oxidation method and ATP- production as estimated by the luminometric method. We investigated the action of nitric oxide donor (sodium nitroprusside) and palmitoylation inhibitor (2-bromopalmitate) on the distribution of membrane-bound-S-nitrosylated and palmitoylated-H-Ras in hypoxic/normoxic condition of undifferentiated/differentiated pheochromocytoma (PC12) cells.

We have shown that hypoxia did not influence nitrosylation of soluble H-Ras in ND PC12 cells. Under hypoxic conditions, the nitrosylation of soluble-H-Ras greatly decreased in D PC12 cells. SNP didn't change the levels of nitrosylation of soluble-H-Ras, in either

hypoxic or normoxic conditions. On the other hand, hypoxia, per se, did not affect the nitrosylation of membrane-bound-H-Ras in D and ND PC12 cells. SNP-dependent nitrosylation of membrane-bound-H-Ras was greatly increased in D PC12 cells. Both unmodified normal and mutated H-Ras enhanced the mitochondrial synthesis of ATP, whereas the stimulatory effects on ATP synthesis were eliminated after S-nitrosylation of H-Ras. Also, we have investigated that in normoxic conditions sodium nitroprusside increases membrane-bound H-Ras nitrosylation only in differentiated cells, whereas in hypoxic conditions sodium nitroprusside stimulates H-Ras nitrosylation in both, differentiated/undifferentiated cells. Sodium nitroprusside doesn't change H-Ras palmitoylation in differentiated cells, whereas, in undifferentiated cells, it greatly decreases protein palmitoylation. Such reduction in palmitoylated-H-Ras was observed only in hypoxic conditions. Furthermore, western blot analyses have shown that sodium nitroprusside greatly decreases ERK phosphorylation under hypoxic conditions in parallel with the elevation in hypoxia-induced factor activity and intracellular succinate concentration. According to the results, it may be proposed that hypoxia can decrease S-nitrosylation of soluble-H-Ras in D PC12 cells and abolish the inhibitory effect of NO-H-Ras in mitochondrial oxidative metabolism. We suggest that hypoxia-formed nitric oxide high concentration can nitrosylate H-Ras-terminal-cysteines, which induces H-Ras activity dysregulation and alters cell response to hypoxia.

Key Words: H-Ras; PC12; Ras-GTPases; palmitoylation; nitrosylation; hypoxia; succinate; Cell Hypoxia; Nitric Oxide; Mitochondria; ATP.

მადლობა

წარმოდგენილი სადისერტაციო კვლევა შესრულებულია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის, ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტში. დისერტაციაზე მუშაობის პერიოდში ინსტიტუტის თითოეული თანამშრომელისაგან ვგრძნობდი ძალიან დიდ თანადგომას, ყურადღებას და პროფესიულ მხარდაჭერას, რისთვისაც უდიდესი მადლობა მინდა გადავუხადო თითოეულ მათგანს. წარმოდგენლად მიმაჩნია ჩემს მიერ შესრულებული სადისერტაციო კვლევა მათი თანადგომისა და მხარდაჭერის გარეშე.

განსაკუთრებული მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემს ხელმძღვანელს, ასოც. პროფ. თამარ ბარბაქაძეს. მადლობას ვუხდის მის მიერ გაწეული უდიდესი შრომისა და დაუღალავი სწავლებისათვის, საკუთარი ენერჯის, დროისა და გამოცდილების დაუზოგავად გაზიარებისათვის. ქნ. თამართან მუშაობა იყო უდიდესი გამოცდილება და ასევე დიდი ბედნიერება. მისი დახმარებით და გვერდში დგომით ჩამომიყალიბდა როგორც თეორიული, ასევე ლაბორატორიაში მუშაობის პრაქტიკული უნარ-ჩვევები.

ასევე, განსაკუთრებულ მადლობას ვუხდის ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტის დირექტორს, აკადემიკოს ბნ. დავით მიქელაძეს, რომელმაც მომცა საშუალება, რომ მემუშავა ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის მაღალპროფესიულ, შეკრულ და საოცრად კოლეგიალურ გუნდთან ერთად. ჩემი სადისერტაციო კვლევა მიმდინარეობდა მისი უშუალო მეთვალყურეობით და ხელმძღვანელობით.

სარჩევი

სარჩევი	ix
სურათების ჩამონათვალი	xii
აბრევიატურების ჩამონათვალი	xiv
შესავალი.....	1
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	9
თავი 1. ცილების პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციები.....	9
1.1. ცილების პალმიტოილირება და შიდაუჯრედული გადაადგილება	10
1.2. S-ნიტროზილირება	11
1.3. NO-ს წარმოქმნა ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში	13
1.4. ცილების S-ნიტროზილირება, დენიტროზილირება და ტრანსნიტროზილირება	14
1.5. ჟანგვითი რეაქციები რთავენ S-ნიტროზილირების რეაქციებს.....	16
1.6. S-ნიტროზილირების როლი სხვადასხვა ცილების რეგულაციაში.....	17
1.7. S-ნიტროზილირება და მიტოქონდრიული დისფუნქციები	18
თავი 2. Ras-ის ბიოლოგიური მნიშვნელობა.....	20
2.1. Ras-ის სტრუქტურა და ბიოლოგიური მექანიზმი.....	20
2.2. Ras-ის ფუნქცია უჯრედის რეგულაციურ პროცესში	26
2.3. Ras-ის ნიტროზილირება	29
2.4. Ras ცილის პალმიტირება	31
2.5. Ras ცილის შიდაუჯრედული გადანაწილება	32
თავი 3. ჰიპოქსია და მისი როლი ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში.....	36

3.1. აზოტის ოქსიდის როლი თავის ტვინში მიმდინარე ჰიპოქსია-იშემიურ პროცესებში.....	36
3.2. აზოტის ოქსიდის როლი იშემიის დროს. ნეიროპროტექტორი თუ ნეიროტოქსიური აგენტი?	37
მეთოდოლოგია	38
თავი 1. უჯრედული ხაზის მომზადება და ფრაქციონირება	39
1.1. PC-12 უჯრედული ხაზის კულტივირება. დიფერენცირებული და არადიფერენცირებული PC-12 უჯრედების მიღება.....	39
1.2. მემბრანული, ციტოპლაზმური და ბირთვული ფრაქციის მომზადება PC-12 უჯრედული ხაზიდან	41
1.3 საქონლის თავის ტვინიდან მიტოქონდრიების გამოყოფა	42
თავი 2. უჯრედული ცილების ანალიზი	43
2.1. იმუნოპრეციპიტაცია	43
2.2. ნიტროზილირებული H-Ras-ის დეტექცია	44
2.3. პალმიტირებული H-Ras დეტექცია	44
2.4. SDS-PAGE ელექტროფორეზი და ვესტერნ-ბლოტინგი	46
თავი 3. უჯრედული მეტაბოლიტების შეფასება	47
3.1. სუქცინატის რაოდენობრივი განსაზღვრა	47
3.2. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა.....	47
თავი 4. მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის შესწავლა	48
4.1. H-Ras-ის ნიტროზილირება	47
4.2. მიტოქონდრიული H_2O_2 წარმოქმნის განსაზღვრა	48
4.3. ATP-ის წარმოქმნა	49

თავი 5. სტატისტიკური ანალიზი.....	50
მიღებული შედეგები.....	50
თავი 1. S-ნიტროზილირებული H-Ras-ის უჯრედშიდა გადანაწილება დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს.....	50
თავი 2. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი იწვევს H-Ras-ის დეპალმიტირებას და ცვლის უჯრედულ პასუხს ჰიპოქსიაზე დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC12 უჯრედებში.....	54
მიღებული შედეგების განხილვა	61
დასკვნები	68
გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი	69

სურათების ჩამონათვალი

სურათი 1. ცილების ცისტეინის ნაშთის პალმიტოილირება. პალმიტირებულ ცილას უნარი აქვს შიდაუჯრედულ მემბრანებზე და პლაზმურ მემბრანაზე გადაადგილების.....	10
სურათი 2. აზოტის ოქსიდის სინთაზას მონაწილეობით L-არგინინიდან აზოტის ოქსიდის წარმოქმნა	12
სურათი 3. ნიტროზილირების როლი ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პროცესებში.....	15
სურათი 4. Ras ცილის პოსტრანსლაციური მოდიფიცირება: პრენილირება, პროტეოლიზი, მეთილირება, პალმიტილირება.....	21
სურათი 5. Ras ცილის დაღმავალი სასიგნალო გზები	28
სურათი 6. Ras ცილის გადანაწილება შიდაუჯრედულ სტრუქტურებზე.....	33
სურათი 7. PC-12 უჯრედები (ATCC®, CRL1721.1™). A. არადიფერენცირებული და B. დიფერენცირებული PC-12 უჯრედები	40
სურათი 8. ციტოპლაზმური, მემბრანა დაკავშირებული H-Ras-ის და ციტოპლაზმური, მემბრანა დაკავშირებული ნიტროზილირებული H-Ras-ის (NO-H-Ras) საერთო რაოდენობა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში.....	52
სურათი 9. ნორმალური H-Ras-ის, მუტანტური H-Ras ^{V12} -ის (m-H-Ras), ნორმალური ნიტროზილირებული H-Ras-ის (NO-H-Ras) და მუტანტური ნიტროზილირებული H-Ras ^{V12} -ის (m-NO-H-Ras) მოქმედება მიტოქონდრიების ოქსიდაციურ მეტაბოლიზმზე.....	53

სურათი 10. ციტოტოქსიკურობის განსაზღვრა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში.....	55
სურათი 11. მემბრანა-დაკავშირებული NO-H-Ras და მემბრანა-დაკავშირებული palm-H-Ras-ის განსაზღვრა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში	57
სურათი 12. ERK, p-ERK და β-აქტინის ანალიზი დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. ERK და p-ERK-ის იმუნობლოტინგი და სიმკვრივის დონე PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში.....	59
სურათი 13. HIF-1-ალფას განსაზღვრა ბირთვში და სუქცინატის შემცველობის ანალიზი ციტოპლაზმაში არადიფერენცირებულ და დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედების ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში	60
სურათი 14. H-Ras-ის რეგულირების სქემატური გამოსახულება ნორმოქსია/ჰიპოქსიის დროს.....	67

აბრევიატურის ჩამონათვალი

ATP - ადენოზინ ტრიფოსფატი

2BP -2-ბრომოპალმიტატი

D – დიფერენცირებული

DMEM - დიულბეკოს მოდიფიცირებული იგლის არე

ERK – უჯრედგარე პასუხის კინაზა

FBS - ჩანასახოვანი ხარის შრატი

GAP- გუანოზინ ტრიფოსფატაზას გამააქტივებელი ცილა

GTP -გუანოზინ ტრიფოსფატი

GTP-აზა - გუანოზინ ტრიფოსფატაზა

GDP -გუანოზინ დიფოსფატი

GDS - გუანიდინის ნუკლეოტიდების დისოციაციის სტიმულატორი

H - ჰიპოქსია

H₂O₂ -წყალბადის ზეჟანგი

HAM -ჰიდროქსილამინი

HIF -ჰიპოქსიით ინდუცირებული ფაქტორი

HS-ცხენის შრატი

LB - ლიზის-ბუფერი

LPA - ლიზოზოსფატიდური მჟავა

LDH - ლაქტატდეჰიდროგენაზა

MAP - მიტოგენებით აქტივირებადი პროტეინკინაზა

Mn-SOD - მაგნიუმ-დამოკიდებული სუპეროქსიდდისმუტაზა

MLB - მემბრანული ლიზის ბუფერი

N - ნორმოქსია

ND- არადიფერენცირებული

NEM- N-ეთილმალეიმიდი

NGF - ნერვული ზრდის ფაქტორი

NMDA - N-მეთილ-D-ასპარტატი

NO - აზოტის ოქსიდი

OS - ოქსიდაციური სტრესი

PI-3K - ფოსფატიდილ-3-კინაზა

PC-12 უჯრედული ხაზი - ვირთხის თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინოვანი შრის ფეოქრომოციტომას უჯრედული ხაზი

PMSF - ფენილმეთანსულფონილ ფლუორიდი

PTM - პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია

ROS - ჟანგბადის აქტიური ფორმები

SNP - ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი

TCA – სამნახშირბადიან მჟავათა (ლიმონჟავა) ციკლი

WB - ვესტერნ ბლოტინგი

ად - ალცჰაიმერის დაავადება

ER- ენდოპლაზმური ბადე

შესავალი

ისეთი გლობალურად გავრცელებული დაავადებები, როგორც არის სიმსივნეები, პარკინსონიზმი, ალცჰაიმერის დაავადება, ამიოტროფული ლატერალური სკლეროზი და სხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებები საკმაოდ ფართოდ არის გავრცელებული და ასაკის მატებასთან ერთად იზრდება მათი განვითარების რისკი. ძირითადი გამომწვევი მიზეზები დადგენილია და ამ დაავადებების ძირითადი დამანგრეველი მექანიზმები მეტნაკლებად იდენტიფიცირებულია, მათ შორის არის მომატებული ოქსიდაციური/ნიტროზული სტრესი, მიტოქონდრიული დისფუნქციები, ცილის მისფოლდინგი/აგრეგაცია, სინაფსური დანაკარგები და ნეირონების სიცოცხლისუნარიანობის შემცირება. თუმცა, ამ ნეიროდეგენერაციული დაავადებების ზუსტი უჯრედული და მოლეკულური მექანიზმები ჯერ კიდევ რჩება გაურკვეველი (Nakamura T. et al., 2007). ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარების უამრავი მიზეზიდან შეიძლება განსაკუთრებით გამოიყოს ჰიპოქსია, რაც წარმოადგენს ჟანგბადის მიწოდების შეზღუდვას. ჟანგბადის ნორმალური მიწოდება აუცილებელია თავის ტვინის ნორმალური ფუნქციონირებისათვის. კლინიკურად, ქრონიკული ჰიპოქსია არის ზოგადი პათოფიოლოგიური გავრცელებული მდგომარობა, რომელიც მნიშვნელოვნად ხელს უწყობს ისეთი ფართოდ გავრცელებული დაავადებების განვითარებას, როგორცაა: ცხელება, ფილტვების ქრონიკული ობსტრუქციული დაავადება, სიმსივნე, ინსულტი და ნეიროდეგენერაციული დაავადებები (Michiels. et al., 2004). ჰიპოქსიურ მდგომარეობაზე ნეირონული პასუხი შეიძლება იყოს მრავალფეროვანი და შესაძლოა მოიცავდეს ოქსიდაციურ სტრესს, ნეიროტრანსმიტერების ცვლილებას, შეცვლილ ბიოენერგეტიკას, შეცვლილ ნეირომორფოლოგიას და დარღვეულ იონურ ჰომეოსტაზს. მრავალი ნაშრომი ადასტურებს ჰიპოქსიურ და იშემიურ სტრესში გლუტამატით გამოწვეული

ციტოტოქსიკურობის ჩართულობას. დადგენილია, რომ ჰიპოქსია იწვევს ნეირონში კალციუმის დიდი რაოდენობით შემოდინებას NMDA რეცეპტორის გზით და უჯრედის სიკვდილს (Hota SK, et al., 2008). ზოგიერთ ასპექტში ნეიროდეგენარციულ უჯრედში მიმდინარე მოლეკულური მექანიზმები მსგავსია ჰიპოქსიით გამოწვეული უჯრედული სიკვდილის დროს მიმდინარე მოლეკულური მექანიზმებისა, როგორც კალციუმის ჰომეოსტაზის დარღვევა, მიტოქონდრიული აქტივობის და უჯრედული ბიოენერგეტიკის ცვლილება (Wang and Michaelis, 2010). ზემოხსენებული პროცესები რეგულირდება სხვადასხვა უჯრედული სასიგნალო გზებით, რომლებშიც ჩართულია უამრავი ცილა. მათი რეგულაცია ხორციელდება არამარტო გენეტიკური საფუძვლებით, არამედ ეპიგენეტიკურად. ბოლო წლებია ძალიან დიდ ყურადღებას იწვევს ცილების პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების გზით მათი რეგულაციის შესწავლა და მათი როლის დადგენა სიმსივნურ პროცესებსა და ნეიროდეგენერაციული დაავადებების განვითარებაში. ცილების პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ მათი სტრუქტურის, ფუნქციის, აქტივობის და დანიშნულების ადგილამდე გადაადგილების განსაზღვრაში. ცილების პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები მრავალფეროვანია და არ შემოიფარგლება მხოლოდ ფოსფორილირებით, იმისთვის, რომ შეძლოს არეგულიროს ცილა-ცილოვანი კავშირი, კატალიზური აქტივობა, გლიკოზილირება, რაც უზრუნველყოფს ცილის შეფუთვის, სიგნალის დეგრადაციისთვის უბიქვითინირებას და ლიპიდირებას ფოსფოლიპიდურ მემბრანაში ჩასაშენებლად (Finley D, et al., 2004; Moremen KW, et al., 2012; Resh MD. 2012; Bononi A. et al., 2011). რადგან პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები ძალიან ზუსტად რეგულირდება, გაზრდილმა უჯრედულმა სტრესმა შეიძლება გამოიწვიოს სისტემის ცვლილება და არასპეციფიკური პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების წარმოქმნა, რომლებიც ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პირობებში არ წარმოიქმნება. ცილების პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები (PTM) ზრდიან პროტეომის ფუნქციურ მრავალფეროვნებას, მათთან ფუნქციური ჯგუფების ან ცილების

კოვალენტური ბმით დაკავშირების შედეგად, რეგულატორული სუბერთეულის პროტეოლიტიკური გახლეჩვის და მთლიანი ცილის დეგრადაციის შედეგად. ეს მოდიფიკაციები მოიცავენ: ფოსფორილირებას, გლიკოზილირებას, უბიქვითინირებას, ნიტროზილირებას, მეთილირებას, აცეტილირებას, ლიპიდირებას და პროტეოლიზს. ისინი გავლენას ახდენენ ნორმალური უჯრედის ბიოლოგიის და პათოგენეზის თითქმის ყველა ასპექტზე. შესაბამისად, პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების იდენტიფიცირება და მათი როლის ზუსტი შესწავლა მნიშვნელოვანია უჯრედული ბიოლოგიის და დაავადებების მკურნალობისა და პრევენციის სწავლებაში.

Ras ონკოგენების ოჯახი შეისწავლება ძალიან ინტენსიურად ბოლო 40 წლის განმავლობაში (Fernández-Medarde A, et al., 2021). 40000-ზე მეტი სამეცნიერო ნაშრომია გამოქვეყნებული მოცემულ საკითხზე ამ პერიოდის განმავლობაში. Ras ცილების ფუნდამენტური მონაწილეობა პათოლოგიურ პროცესებში, როგორცაა ნეიროდეგენერაციული დაავადებები, სიმსივნე და უჯრედული პროლიფერაციის, დიფერენცირების და სიცოცხლისუნარიანობის მაკონტროლირებელ ფიზიოლოგიურ პროცესებში, ამართლებს სამეცნიერო ლიტერატურის ინტერესს, რომელიც ყოველთვის ითვლის 200-300 გამოქვეყნებულ ნაშრომს. ამერიკის საკვებისა და წამლის სააგენტომ უკვე დაამტკიცა პირველი მედიკამენტი (Vemurafenin) რომელიც ახდენს Ras-ის მიერ გამოწვეული სიგნალის ინჰიბირებას. 2019 წლიდან კი გაიცა კლინიკური კვლევების ჩატარების ნებართვა მსგავსი მოქმედების მქონე პრეპარატებზე, კოდური დასახელებებით (AMG510) და (BI1701963) (Fernández-Medarde A. et al., 2021).

H-*ras*, N-*ras*, და K-*ras* ონკოგენები იყო პირველი ადამიანის ონკოგენები, რომელიც აღმოჩენილი იყო ადამიანის სიმსივნეებში პირველად 40 წლის წინ და წამოადგენენ საკმაოდ ვრცელი Ras გენების ზეოჯახის წევრებს. Ras გენების ზეოჯახი მოიცავს 150-მდე სხვადასხვა უჯრედულ წევრებს. როგორც არის მიმოხილული სხვადასხვა ნაშრომებში. უჯრედის სასიგნალო გზებს შორის, H-Ras, N-Ras და K-Ras-

ის მონაწილეობა Ras-Raf-MAPK სასიგნალო გზაში მნიშვნელოვანია ეუკარიოტული უჯრედების პროლიფერაციის, დიფერენცირების და სიცოცხლისუნარიანობისთვის. მართლაც, ევოლუციურად ამ გზების მნიშვნელობა და აქტუალობა ხაზგასმულია მზარდ რიცხვთან იმ პათოლოგიური პროცესებში, რომლებიც დაკავშირებულია რომელიმე ამ კომპონენტებიდან თუნდაც ერთ-ერთის ცვლილებასთან. (Alberto Fernández-Medarde and Eugenio Santos, 2011). ამრიგად, Ras-ის ცილოვანი კასკადი წარმოადგენს უჯრედშიდა რეგულაციურ სისტემას, რომელიც პასუხობს მრავალი ტიპის გაღიზიანებას, რომელზეც გადაიკვეთება უჯრედისათვის სასიცოცხლო მნიშვნელობის პრო და ანტიაპოპტოზური გზები (Frame S. et al., 2001).

Ras ცილები წარმოადგენენ დაბალი მოლეკულური მასის მქონე GTP-აზებს, რომლებიც არეგულირებენ უჯრედის პროლიფერაციის, დიფერენციაციის, მიგრაციის და აპოპტოზის პროცესებს (Malumbres M, et al., 2003). Ras ცილები წარმოადგენენ პროტო-ონკოგენებს, რომლებიც ხშირად განიცდიან მუტაციას სიმსივნური დაავადებების დროს. Ras-ის რეგულირება ხდება პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების მეშვეობით, როგორებიცაა ფარნეზილირება, მეთილირება და პალმიტირება. ეს მოდიფიკაციები წარმოადგენენ აუცილებელ პირობას Ras-ის იზოფორმების გადანაწილებისას უჯრედის მემბრანასა და უჯრედშიდა მემბრანულ სტრუქტურებს შორის, როგორიცაა გოლჯის აპარატი, ენდოპლაზმური რეტიკულუმი და მიტოქონდრია (Fehrenbacher N, et al., 2009). მემბრანულ სტრუქტურებს შორის მსგავსი გადანაწილება გავლენას ახდენს Ras სასიგნალო გზაზე, ვინაიდან Ras-ის იზოფორმები, რომლებიც მდებარეობენ უჯრედის მემბრანაზე და უჯრედშიდა მემბრანულ სტრუქტურებზე წარმოქმნიან განსხვავებულ სიგნალებს (Prior IA, et al., 2012-a). Ras ცილის ლოკალიზაცია და აქტივობა მჭიდროდაა დაკავშირებული მის პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციებთან მათ C-ტერმინალურ უბანზე. იზოპრენილირებული ცისტეინის გარდა H-Ras-ს გააჩნია ცისტეინის ორი ნაშთი (C181, C184) C-ტერმინალურ უბანში, რომლებიც პალმიტირდებიან ერთხელ ან ორჯერ. პალმიტირება ხელს უწყობს პლაზმურ

მემბრანაში მის სტაბილურ მდებარეობას (Ahearn IM, et al., 2011). ეს მოდიფიკაცია შექცევადია, ვინაიდან აცილპროტეინთიოესტერაზა წყვეტს თიოესთერულ ბმებს და შედეგად Ras ცილები გადადიან ხსნად მდგომარეობაში (Dekker FJ, et al., 2010). C-ტერმინალურ უბანზე H-Ras-ის შექცევადი პალმიტირება მნიშვნელოვანია ცილის სათანადო ადგილზე ლოკალიზაციისა და ძირითადი ფუნქციების განხორციელებისათვის (Baker TL, et al., 2003). პალმიტირებადი ცისტეინის ნაშთების მუტაცია იწვევს H-Ras ცილის მდებარეობის ცვლილებას, რაც თავის მხრივ იწვევს ცრუ უჯრედულ სიგნალებს (Ahearn IM, et al., 2011; Baker TL, et al., 2003). პალმიტირების მიმოცვლის სიხშირე შესაძლოა კრიტიკული გახდეს Ras ცილის გადაადგილებისთვის გოლჯის აპარატსა და პლაზმურ მემბრანას შორის. ქიმიური ნივთიერებები, რომლებიც ხელს უშლიან პალმიტირების პროცესს და ამით ახდენენ ონკოგენური Ras სასიგნალო აქტივობის მოდულირებას, შეიძლება ეფექტური იყოს სიმსივნის საწინააღმდეგოდ Ras-ით გაშუალებული ქიმიოთერაპიის მართვაში (Kang R, et al. 2008; Chamberlain LH, et al., 2015).

ყურადსაღებია ფაქტი, რომ H-Ras-ის ტერმინალური ცისტეინის უბნები შესაძლოა სამიზნე გახდეს სხვადასხვა მცირე მოლეკულისათვის ან ბიოლოგიური შუამავლებისათვის, რომელთაც გააჩნიათ თიოლის ჯგუფების მიმართ დაკავშირების უნარი (Rainey KW, et al., 2007; Oestle CL, et al., 2011;). ნაჩვენებია, რომ H-Ras ცილის ტერმინალურ უბანზე პალმიტირების ნაცვლად, მეორეს მხრივ შესაძლოა მოხდეს ნიტროზილირება (Mallis RJ, et al., 2001). H-Ras-ში Cys-ის ნაშთის S-ნიტროზილირება დამოკიდებულია NO-ს კონცენტრაციაზე. NO-ს დაბალ დონეს (<0.1 მკმ) აქვს უნარი მოახდინოს Cys118 ცისტეინის ნიტროზილირება, ხოლო მაღალ კონცენტრაციებს (>0.1 მკმ) შეუძლიათ ტერმინალური Cys-ის ნაშთის S-ნიტროზილირება (Baker T, et al., 2000; Batista WL, et al., 2013; Mallis RJ, et al., 2001). ტერმინალური ცისტეინი, როგორც წესი, წარმოადგენს სამიზნეს ლიპიდური მოდიფიკაციებისთვის და მოიაზრება, როგორც პოტენციური ადგილი რეგულატორული ნიტროზილირების რეაქციებისთვის (Mallis RJ, et al., 2001).

უჯრედების დამუშავება ნიტროზილირების გამომწვევი აგენტებით, ამცირებს H-Ras-ის პალმიტირებას (Baker TL, et al., 2003). ამრიგად, უჯრედებში აზოტის ოქსიდის დონის მომატებამ იმ კონცენტრაციამდე, რომელიც საკმარისია ცისტეინის ამ ტერმინალური უბნის ნიტროზილირებისთვის, შეიძლება გამოიწვიოს პალმიტირების დათრგუნვა და შემდგომ ორმაგ ლიპიდურ შრეში აბსორბცია. H-Ras-ის ფოსფოლიპიდებთან ასოციაცია/დისოციაციის კინეტიკის ანალიზმა აჩვენა, რომ ფარნეზილირებული H-Ras ცილის S-ნიტროზოციტეინით წინასწარ დამუშავებამ შეამცირა H-Ras-ის ინკორპორაცია ფოსფოლიპიდებში (Shanshiashvili L, et al., 2011). ოქსიდაციური/მეტაბოლური სტრესის დროს დამჟანგველი აგენტების რაოდენობის მატებამ შეიძლება მოახდინოს თიოლის ჯგუფების დაჟანგვა Cys181/184-ში, რამაც შეიძლება შეცვალოს H-Ras-ის პალმიტირების სტატუსი (Burgoyne JR, et al., 2012) და შემდგომში მისი უჯრედშიდა მდებარეობა. სხვადასხვა სუბუჯრედულ ნაწილებში Ras-ცილის NO-მოდულირების გათვალისწინებით, რომლებიც არეგულირებენ სხვადასხვა დადმავალ სასიგნალო გზებს (Batista WL, et al. 2013), H-Ras-ის S-ნიტროზილირება გადამწყვეტია Ras-ით გამოწვეული პათოლოგიებისთვის, როგორცაა სიმსივნური დაავადებები.

დაგროვილი მტკიცებულებებიდან გამომდინარე ვფიქრობთ, რომ არარეგულირებადი, დაქვეითებული ან გადაჭარბებული S-ნიტროზილირება შეიძლება ჩართული იყოს პათოფიზიოლოგიური მდგომარეობების ფართო სპექტრში (Foster MW, et al., 2003).

ჰიპოქსიით ან რეაქტიული ჟანგბადის/აზოტის მომატებული რაოდენობით ინიცირებულმა ზოგიერთმა უჯრედულმა სტრესმა შესაძლოა გამოიწვიოს სხვადასხვა ცილების S-ნიტროზილირება და შემდგომ სტრესზე სასიგნალო პასუხის დარღვევა (Nakato R, et al., 2015). ჰიპოქსიას შეუძლია გამოიწვიოს მიტოქონდრიის მიერ ROS-ის გამომუშავების სტიმულირება, რაც თავის მხრივ ააქტიურებს ჰიპოქსიით ინდუცირებად ტრანსკრიფციის ფაქტორ 1-ს (HIF1) (Bell EL, et al., 2007; Gorrini C, et al., 2013). ჰიპოქსიურ პირობებში, ფონ ჰიპელლინდაუს პროტეინის

(VHL) და HIF-ალფა სუბერთეულების S-ნიტროზილირება ხელს უშლის HIF-ის პოლიუბიქვითინირებას და შემდგომ დაშლას (Ho JJ, et al., 2012), რაც შეიძლება მნიშვნელოვანი იყოს სიმსივნის პროგრესირებისას ანგიოგენეზის გასაძლიერებლად. ეგზოგენური ჰიპოქსია ცვლის პრენილირებული ცილების, მათ შორის H-Ras ცილის, ლოკალიზაციას. უნდა აღინიშნოს, რომ ჰიპოქსიის პირობებში H-Ras გადაადგილდება ციტოზოლში და პირიქით, ჟანგბადის მაღალი კონცენტრაციის შემთხვევაში იზრდება უჯრედშიდა ჟანგბადის კონცენტრაცია და H-Ras გადანაწილდება მემბრანაში (Kim A, et al., 2015). ჟანგვითი ფოსფორილირების შემცირება ზრდის ჟანგბადის უჯრედშიდა კონცენტრაციას, რაც იწვევს ცილების პრენილირებას და მათ გადანაცვლებას მემბრანაში (Kim A, et al., 2015).

ამრიგად, სწორედ რომ უჯრედის ოქსიდაციურ სტატუსზე არის დამოკიდებული Ras-ის მობილობა და ადგილმდებარობა, მისი პოსტ-ტრანსლაციური მოდიფიკაცია. ბოლოდროინდელმა კვლევებმა ცხადყო, რომ ფეოქრომოციტომა PC-12 უჯრედებში ჰიპოქსიის ზემოქმედება ამცირებს ციტოპლაზმური H-Ras-ის S-ნიტროზილირებას დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში და ხსნის მიტოქონდრიულ ოქსიდაციურ მეტაბოლიზმზე ნიტროზილირებული NO-H-Ras-ის ინჰიბიტორულ ეფექტს (Barbakadze T, et al., 2017). მეორეს მხრივ, აზოტის ოქსიდს, H-Ras-ის რეგულაციის გზით, შეუძლია მიიღოს მონაწილეობა PC-12 უჯრედების ნეირონული დიფერენციაციის პროცესში (Bátor J, et al., 2012; Kalisch BE, et al., 2003). ზემოაღნიშნულის გათვალისწინებით შეიძლება ითქვას, რომ H-Ras-ის ნიტროზილირებამ შეიძლება ზემოქმედება მოახდინოს როგორც მის აქტივობაზე, ასევე PC-12 უჯრედების დიფერენციაციის პროცესზე. არსებობს მტკიცებულება, რომ აზოტის ოქსიდის დონორის SNP (400 μ M) ტოქსიკური დოზით გამოწვეული აპოპტოზი, შეიძლება ნაწილობრივ გადაილახოს PC-12 უჯრედებში, თუკი მოხდება SNP-ით წინასწარ მცირე დოზით დამუშავება. 100 μ M SNP წინასწარი დამუშავებამ შეამცირა სხვა სტრესული სტიმულების პროაპოპტოზური პოტენციალი, რაც ამტკიცებს მოსაზრებას, რომ ზომიერი აზოტოვანი სტრესი იცავს უჯრედებს მსგავსი

სტრესის პირობების გარკვეული ფორმებისგან (Varga J, et al., 2016). აქედან გამომდინარე ვვარაუდობთ, რომ ჰიპოქსიურ პირობებში, აზოტის ოქსიდის კონცენტრაციის მნიშვნელოვანი ზრდის გამო, H-Ras-ის ტერმინალური ცისტეინები შეიძლება ნიტროზილირდეს, რამაც შეიძლება გამოიწვიოს H-Ras-ის აქტივობის მოდულაცია და მდებარეობის ცვლილება. ამ კვლევით, ჩვენ დავადგინეთ, რომ აზოტის ოქსიდის დონორი - SNP, იწვევს ჰიპოქსიის დროს H-Ras-ის ნიტროზილირებას და დეპალმიტირებას, რაც იწვევს მემბრანასთან ცილის ასოციაციის შემცირებას, ცვლის ERK-ის ფოსფორილირებას და ჰიპოქსიით ინდუცირებული-ალფა-1 ფაქტორის (HIF-1-alpha) აქტივობას.

თუმცა, S-ნიტროზილირებული Ras-ის განაწილება ციტოპლაზმასა და პლაზმურ მემბრანებში ჰიპოქსიურ პირობებში დღემდე არ არის აღწერილი. მდებარეობაშეცვლილი S-ნიტროზილირებული H-Ras-ის (NO-H-Ras) მნიშვნელობა არ არის ბოლომდე შესწავლილი პროლიფერაცია/დიფერენციაციის პროცესებში. გარდა ამისა, Ras-ის იზოფორმებს უჯრედშიდა გადაადგილებისას შეუძლიათ შეცვალონ ჟანგვითი მეტაბოლიზმი მიტოქონდრიაზე პირდაპირი ზემოქმედებით ან არაპირდაპირი გზით მიტოქონდრიასთან ასოცირებული ენდოპლაზმური რეტისკულუმის (MAM) მოდულაციის გზით.

Ras-ის ფუნქციების მოლეკულური საფუძვლების გარკვევა და პათოლოგიურ პროცესებში მისი მნიშვნელობის დადგენა თანამედროვე ბიომედიცინის ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემას წარმოადგენს. წარმოდგენილი კვლევა შესაძლოა მნიშვნელოვანი იყოს სიმსივნური დაავადებების პრევენციისა და თერაპიისთვის, ვინაიდან სიმსივნე არის ერთ-ერთი ყველაზე რელევანტური დარღვევა, რომელიც გამოწვეულია Ras-ის აქტივობის დარღვევით რედოქს აგენტების მიერ. ხშირია H-Ras გენის მიერ გამოწვეული ონკოგენური აქტივაცია უმეტეს ნეოპლასტიურ ტრანსფორმაციებში, ამრიგად, H-Ras აქტივობის რედოქს-რეგულირების გამოკვლევა ძალიან მნიშვნელოვანია სიმსივნური დაავადებების კვლევისთვისაც.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

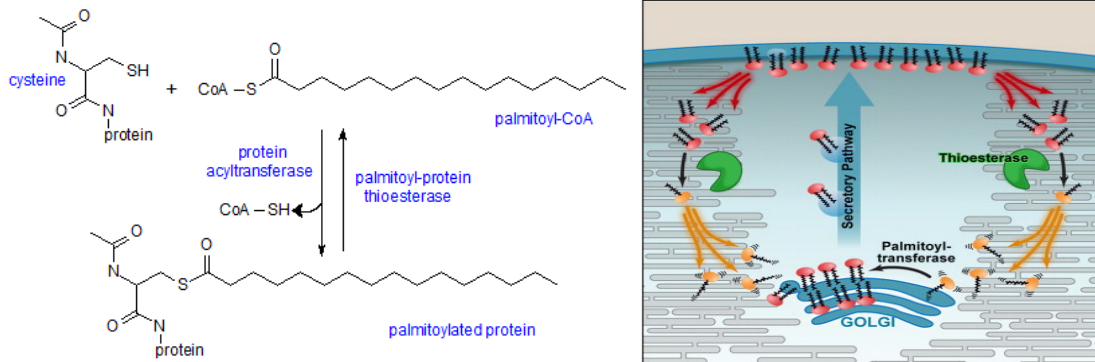
თავი 1. ცილების პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციები

პოსტრანსლაციური მოდიფიკაცია (PTM) წარმოადგენს ბიოქიმიურ მექანიზმს, რომლის დროს ხდება ცილის ამინომჟავური ნაშთების კოვალენტური მოდიფიცირება. ეს არის ბუნების თავის არიდება გენეტიკური ტყვეობიდან. ეგზონების სპლაისინგის შემდეგ ცილების მესამეული სტრუქტურა იცვლება მხოლოდ კონფორმაციული ფლუქტუაციების გზით. PTM საშუალებას იძლევა მოხდეს ამინომჟავების თვისებების ცვლილება მოთხოვნის შესაბამისად. მრავალმხრივ PTM-ს მივყავართ პოტენციური მოლეკულური მდგომარეობების კომბინაციების მრავალფეროვნებისკენ. ასეთი სირთულე და კომპლექსურობა უზრუნველყოფს უჯრედული ინფორმაციის გადამუშავების რთული ფორმების საფუძველს, რომელიც მნიშვნელოვანია ორგანიზმული სირთულის გათვალისწინებით სწრაფი მოქმედებისთვის (Prabakaran, et al., 2012)

პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციები მოიცავენ: ფოსფორილირებას, გლიკოზილირებას, უბიქვითინირებას, ნიტროზილირებას, მეთილირებას, აცეტილირებას, აცილირებას (ლიპიდირება) და პროტეოლიზს. ცილები კოვალენტურად მოდიფიცირდებიან სხვადასხვა ტიპის ცხიმოვანი მჟავებით: ოქტანის მჟავით, მირისტინის მჟავით, პალმიტინის მჟავით, პალმიტოლის მჟავით, ფარნეზილით ან გერანილგერანილის ჯგუფით, ქოლესტეროლით და სხვა. ეს მოდიფიკაციები ძირითადად ხდება ციტოპლაზმაში ან მემბრანის ციტოპლაზმურ მხარეს. ჩვენი ყურადღება ძირითადად გამახვილებული იქნა ნიტროზილირებასა და ე.წ. თიოაცილირებაზე, რომელსაც აგრეთვე ეწოდება S-აცილირება (პალმიტოლირება) (Clara Aicart-Ramos, et al., 2011)

1.1 ცილების პალმიტოილირება და შიდაუჯრედული გადაადგილება

პალმიტირება არის პალმიტინის მჟავის ჯგუფის შექცევადი პოსტტრანსლაციური დაკავშირება (C16:0) ცილის ცისტეინის ნაშთთან თიოესთერული კავშირით. ცილის პალმიტოილირება არის ფერმენტების რეგულირებადი მოდიფიკაცია, ამიტომ, მისი ხანგრძლივობა უფრო ხანმოკლეა, ვიდრე თავად ცილის სიცოცხლე, რომელიც მოდიფიცირდება (სურათი 1). S-პალმიტოილირებული ცილები გამოირჩევიან მრავალფეროვნებით. ზოგიერთი თავიდანვე ასეთი სახით სინთეზირდება, ზოგი ცილა კი ტრანსმემბრანულად გამჭოლი ცილაა, ზოგი მათგანი თანმიმდევრულად მოდიფიცირდება სხვადასხვა ლიპიდებით, ხოლო ზოგი ექსკლუზიურად პალმიტოილირდება. ბოლო წლებია შესაძლებელი გახდა საფუარას, დროზოფილას, თაგვის, დენდრიტული უჯრედული ხაზის და Jurkat T უჯრედების პალმიტოილომის ანალიზი (Clara Aicart-Ramos, et al., 2011). პალმიტოილირებული ცილების საპირისპიროდ ძალიან რთულია პალმიტოილირებაში მონაწილე ფერმენტების გამოყოფა, რადგან ცილასთან პალმიტატის კატალიზურ დაკავშირებაზე პასუხისმგებელი ფერმენტები ძირითადად მემბრანასთან დაკავშირებული ფერმენტებია და მათი გასუფთავება ამის გამო რთულდება. ლინდერის და დემენის ცდებით გამოვლინდა, რომ *Saccharomyces cerevisiae*-ში პალმიტოილირებაზე პასუხისმგებელია Erf2–Erf4 (Ras ფუნქციაზე ზეგავლენა) კომპლექსი, რომელიც პასუხისმგებელია Ras2p პალმიტოილირებაზე და წარმოადგენს ინტეგრალურ ცილას (S. Lobo, et al., 2002; M.E. Linder, et al., 2003).



სურათი 1. ცილებზე ცისტეინის ნაშთის პალმიტოილირება. პალმიტირებულ ცილას უნარი აქვს შიდაუჯრედულ მემბრანებზე და პლაზმურ მემბრანაზე გადაადგილების. (C.S. KIM, et al., 2013; Rocks O, et al, 2010)

საინტერესოა, რომ ცილების კოვალენტური პოსტტრანსლაციური მოდიფიცირება ელექტროფილური ცხიმოვანი მჟავებით ცვლის ცილის სტრუქტურას, მის შიდაუჯრედულ გადაადგილებას და კატალიზურ აქტივობას ისეთი განსხვავებული ცილებისა, როგორცაა ინსულინი, კატეფსინი B, გლიცერალდეჰიდ-3-ფოსფატდეჰიდროგენაზა და სხვა.

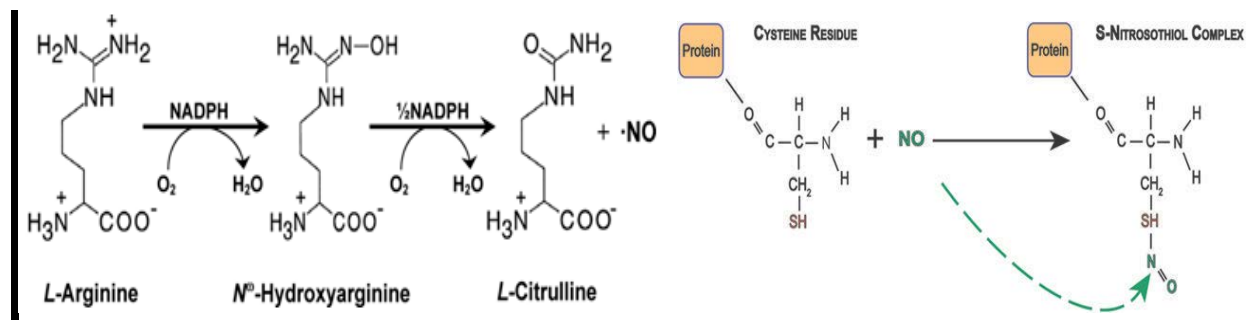
1.2 S-ნიტროზილირება

ძუძუმწოვრების უჯრედებში ნორმალურ პირობებში რეაქტიული ჟანგბადის და აზოტის ფორმები წარმოიქმნებიან მცირე რაოდენობით და წარმოადგენენ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ მესენჯერებს უჯრედშიდა სასიგნალო გზებში. (Finkel, 2011). თუმცა, გარემოს ტოქსინების და მავნე ზემოქმედების შედეგად შესაძლოა განვითარდეს დისბალანსი ROS/RNS წარმოქმნასა და უჯრედულ დამცველობით სისტემის აქტივობას შორის. ნეირონები საკმაოდ მგრძობიარენი არიან ამ დისბალანსის მიმართ, რადგან ენერგეტიკულად დამოკიდებული არიან ROS/RNS წარმომქმნელ მიტოქონდრიულ მეტაბოლიზმზე და სხვა უჯრედებთან შედარებით შეიცავენ ანტიოქსიდანტური სისტემების მცირე რაოდენობას. (Mattson, et al., 2002).

ROS/RNS შედის და ერთიანდება იმ თავისუფალი რადიკალების რიცხვში, რომლებიც მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენენ ბიოლოგიურ ეფექტებზე, მაკრომოლეკულებთან რეაქციაში შესვლის და დაკავშირების გზით.

აზოტის ოქსიდი (NO) წარმოადგენს მცირე ზომის მოლეკულას, რომელიც წარმოიქმნება NO-სინთაზას (NOS) ოჯახის წარმომადგენელთა მიერ. ისინი ნ L-

არგინინს გარდაქმნიან L-ციტრულინად მოლეკულური ჟანგბადის და NADPH გამოყენებით (Bredt et al., 1991) (სურათი 2).



სურათი 2. აზოტის ოქსიდის წარმოქმნა L-არგინინიდან აზოტის ოქსიდის სინთაზას მონაწილეობით. (Manukhina, E. et al 2006; M.P. da Silva et al., 2014)

NOS ოჯახი შედგება სამი წევრისაგან;

- 1) ნეირონული NOS (nNOS ან NOS1)
- 2) ინდუციბელური NOS (iNOS ან NOS2)
- 3) ენდოთელური NOS (eNOS ან NOS3)

nNOS და eNOS სახელები ეწოდათ იმ უჯრედული ტიპების მიხედვით, სადაც ისინი უფრო მეტად ექსპრესირდებიან, ხოლო iNOS წარმოადგენს ტიპიურ მწვავე ანთებით პასუხში მონაწილე ფერმენტს. ძუძუმწოვრების ტვინში ხდება სამივე ტიპის NOS-ს ექსპრესირება. ნაჩვენებია, რომ აზოტის ოქსიდის წარმოებულებს, რომელსაც შეიძლება მივაკუთვნოთ აგრეთვე, დინიტროგენ ტრიოქსიდი (N₂O₃) ან რეაქტიული შუალედური პროდუქტი ნიტროზონიუმის კათიონი (NO⁺) იწვევენ ცილების S-ნიტროზილირებას - შექცევადი კოვალენტური ქიმიური რეაქცია, რომელიც მოიცავს ცისტეინის თიოლურ ანიონზე დამატებითი NO თანმიმდევრობის დაკავშირებას. შედეგად, წარმოიქმნება S-ნიტროზოთიოლი (-SNO), რომელიც განაპირობებს S-ნიტროზილირებული ცილის თვისებებს. მას აღვნიშნავთ, როგორც SNO-ცილებს (Lei, et al., 1992; Stamler, et al., 2001)

მნიშვნელოვანია აღინიშნოს, რომ ცისტეინის თიოლური ჯგუფის S-ნიტროზილირება არის თიოზინის ნაშთის ნიტრირების მკაფიოდ გამოხატული, ქიმიური რედოქს-რეაქცია, რომელიც წარმოადგენს NO-დამოკიდებულ პოსტ-ტრანსლაციურ მოდიფიკაციას.

ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პირობებში S-ნიტროზილირება ცვლის სუბსტრატულ ცილებს, რომლებიც თამაშობენ მნიშვნელოვან როლს ბიოლოგიურ პროცესებში. სხვა პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციების მსგავსად S-ნიტროზილირება იწვევს კონფორმაციულ ცვლილებებს და ცილების მოქმედების მექანიზმის აქტივირებას ან ინჰიბირებას, ცვლის ცილა-ცილოვან ურთიერთქმედებებს, მოქმედებს ცილების აგრეგაციაზე და ასევე ცვლის ცილის მდებარეობას. ზემოაღნიშნული ცვლილებები გავლენას ახდენს უჯრედის სასიგნალო გადაცემის გზებზე და ნეირონთა ფუნქციაზე (Choi et al., 2000; Shi et al., 2013; Uehara T, et al., 2006.)

პათოლოგიური მდგომარეობის დროს, სპეციფიკური ცილების S-ნიტროზილირებით უჯრედში მიმდინარეობს დესტრუქციული პროცესები, რაც იწვევს ნეიროდეგენერაციულ ცვლილებებს. ინსულტი, დაკავშირებულია S-ნიტროზილირებული ცილების მისფოლდინგთან, რომელიც იწვევს ენდოპლაზმური რეტიკულუმის (ER) სტრესს, მიტოქონდრიულ დისფუნქციას, სინაფსური კავშირის დარღვევას და აპოპტოზს (Nakamura and Lipton, 2007). ნიტროზულ სტრესზე დამოკიდებული ექსციტოტოქსიურობა მონაწილეობს ისეთ ნევროლოგიურ დარღვევებში როგორცაა, მწვავე ჰიპოქსია-იშემიური პროცესები, რაც იწვევს ქრონიკულ ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებს. S-ნიტროზილირებაზე ზემოქმედების გზით შესაძლებელია ამ პათოლოგიებთან გამკლავება. მაგალითად, ფარმაკოლოგიური პრეპარატების, nNOS ინჰიბიტორების ან nNOS გენის დათრგუნვით შესაძლებელია ნერვული ქსოვილის დაცვა ნიტროზული სტრესისგან (Huang et al., 1994).

1.3 NO-ს წარმოქმნა ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში.

NO-ს წარმოშობა სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში ხდება NMDA რეცეპტორების აქტივაციით (NMDARs). თავის ტვინში, nNOS უპირატესად

ექსპრესირდება ნეირონებში და უკავშირდება NMDARs და PSD-95 პოსტსინაფსური სიმკვრივეში. აქტივირებული NMDAR იწვევს Ca^{2+} -ის შემოსვლას, რის შედეგად აქტივდება nNOS, რომელიც თავის მხრივ ახდენს NO-ს სინთეზს (Bredt et al., 1991). მათი აქტივაციით ასევე ხდება ROS-ის გენერირება (Lafon-Cazal et al., 1993).

ნეიროანთებითმა სტიმულმა ან სხვადასხვა სახის ტოქსინებმა (მაგალითად, 1-მეთილ-4-ფენილ-1,2,3,6-ტეტრაჰიდროპირიდინი [MPTP]) შესაძლოა გამოიწვიოს iNOS-ს სინთეზი თავის ტვინში. ძირითადად ასტროციტებში, მაკროფაგებში და მიკროგლიურ უჯრედებში. iNOS განაპირობებს NO-ს კონცენტრაციის მომატებას და იწვევს ნეიროტოქსიკურობას. iNOS-ს გენის ნოკაუტის ან ნოკდაუნის მქონე პარკინსონიანი ცხოველის მოდელზე ჩატარებული ცდებით ნაჩვენებია იყო რეზისტენტულობა MPTP-ით გამოწვეული ნეიროტოქსიკურობის მიმართ (Liberatore et al., 1999). ამასთან, iNOS-ს გენეტიკური აბლაცია ალცჰაიმერიანი ცხოველების მოდელზე ჩატარებული ცდების მიხედვით ზრდის ალცჰაიმერის დაავადებისთვის დამახასიათებელ სიმპტომებს, β -ამილოიდის რაოდენობას და ასტროციტოზი/მიკროგლიოზის ფარდობას (Nathan et al., 2005). თუმცა, ამავე დროს ამ გენის დელეცია აუარესებს სივრცით მეხსიერებას, დასწავლას და ა.შ (Wilcock et al., 2008)

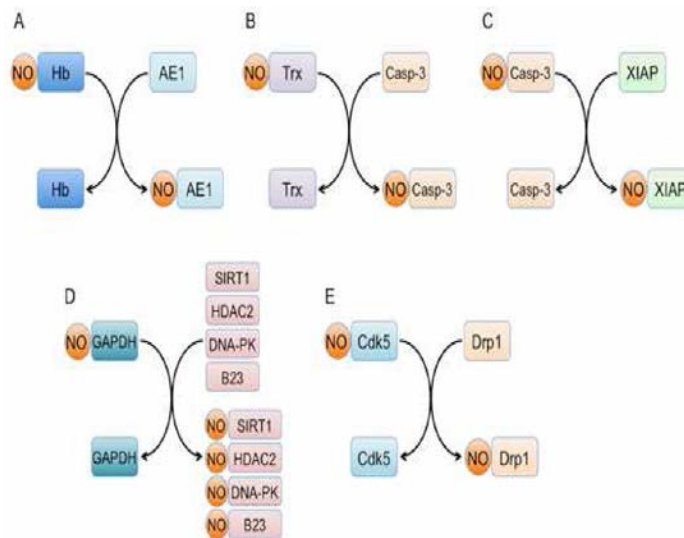
1.4 ცილების S-ნიტროზილირება, დენიტროზილირება და ტრანსნიტროზილირება.

დღევანდელი მდგომარეობით ცნობილია ათასობით ცილა, რომლებსაც გააჩნიათ S-ნიტროზილირების პოტენციალი (Seth and Stamler, 2011). მიუხედავად იმისა, რომ ცილების უმეტესობა შეიცავს მრავალ ცისტეინის ნაშთებს, მხოლოდ სპეციფიკური ცისტეინის ნაშთი განიცდის S-ნიტროზილირებას. მაგალითად, nNOS-თან კომპლექსნაერთების წარმოქმნის გზით მის მიერ ხორციელდება NMDAR-ს და

PSD-95-ის S-ნიტროზილირების პროცესის რეგულაცია (Lei et al 1992; Lipton et al., 1993; Ho et al., 2011).

SNO-ცილების წარმოქმნის რეგულაცია ხორციელდება დენიტროზილირებადი ენზიმების მიერ, რომლის წარმომადგენლებია S-ნიტროზოგლუტათიონრედუქტაზა, თიორედოქსინული სისტემა და პროტეინდისულფიდიზომერაზა (PDI). ეს დენიტროზილირებადი აგენტები ახდენენ NO-ს მოცილებას S-ნიტროზილირებული ცისტეინის ნაშთიდან და ამსუბუქებენ ნიტროზულ სტრესს დაავადების მიმდინარეობისას (სურათი 3).

ტრანსნიტროზილირება შესაძლოა წარმოადგენდეს წამყვან ენზიმურ მექანიზმს S-ნიტროზილირებული ცილების გენერირებისას ბიოლოგიურ სისტემებში. ტრანსნიტროზილირებისას ხორციელდება NO-ს გადატანა დონორი ცილის რეაქტიული ცისტეინის ნაშთიდან აქცეპტორულ ცილაზე. შედეგად მიიღება დენიტროზილირებული და SNO-ცილა. ცილები რომელიც იკავშირებს NO-ს ჯგუფს ტრანსნიტროზილირების გზით, შესაძლოა უკავშირდებოდნენ დენიტროზილირებად ენზიმებს, იმისთვის, რომ მოახდინონ NO ჯგუფის გადატანა სხვა S-ნიტროზილირებად ცილაზე. ტრანსნიტროზილირების მაგალითები მოცემულია სურათი 3-ზე.



სურათი 3. ნიტროზილირების როლი ფიზიოლოგიურ და პათოლოგიურ პროცესებში. (A) ჰემოგლობინიდან ანიონ-ცვლადი ცილა 1 (AE1). (B) თიორედოქსინ 1 (Trx1) და კასპაზა-3 (Casp-3)-ზე.

(C) კასპაზა-3 (Casp-3)-დან აპოპტოზის X-შეჭიდულ ინჰიბიტორზე (XIAP). (D) GAPDH-დან - HDAC2/SIRT1/DNA-PK.-ზე, (E) Cdk5-დან დინამინ დაკავშირებულ ცილა 1-ზე (Dnp1). (Nakamura T, et al, 2013)

1.5. ჟანგვითი რეაქციები რთავენ S-ნიტროზილირების რეაქციებს

S-ნიტროზილირებას შეუძლია გავლენა მოახდინოს ცილის სტრუქტურის კონფორმაციულ ცვლილებაზე, რაც შესაძლოა უფრო უწყობდეს ხელს ოქსიდაციურ რეაქციებს ნაკლებად აქტიური ROS-ის თანაობისას, (-SOH), (-SO₂H) ან (-SO₃H)-ის დერივატიზაციით ცისტეინ თიოლურ ჯგუფზე. სულფონირება (-SO₃H) შეუქცევადი პროცესია და ამიტომაც, ისინი იწვევენ შეუქცევად პათოლოგიურ ცვლილებებს ცილის სტრუქტურაში და ცვლიან მათ აქტივობას (Gu, et al., 2002). საინტერესოა, რომ სულფირება (-SO₂H) განსხვავებით სულფონირებისაგან (-SO₃H) შექცევადი პროცესია, ამიტომ, შესაძლებელია NMDAR რეცეპტორის ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პირობებში დაბრუნება.

გარდა ამისა, ცნობილია, რომ S-ნიტროზილირება გავლენას ახდენს ცისტეინის ნაშთების შემდგომ პოსტ-ტრანსლაციურ მოდიფიცირებაზე. მაგალითად, როდესაც ცილის შემადგენლობაში არის ორი მეზობელი ცისტეინის ნაშთი, ერთი მათგანის S-ნიტროზილირებამ შეიძლება ხელი შეუწყოს მათ შორის დისულფიდური ბმის ფორმირებას (Lipton et al., 2002; Stamler and Toone, 2002; Cho et al., 2009). ამის საპირისპიროდ, თუ ორივე ცისტეინის ნაშთი არის S-ნიტროზილირებული, მაგ., ძლიერ ნიტროზულ პირობებში, S-ნიტროზილირება აფერხებს დისულფიდის წარმოქმნას (Hess et al., 2005; Uehara et al., 2006). უფრო მეტიც, ცისტეინის ნაშთის S-ნიტროზილირება შეიძლება წინ უსწრებდეს და ამით თრგუნავდეს პალმიტირებას (Ho et al., 2011). ვინაიდან პალმიტირება ზრდის ცილის კავშირს უჯრედის მემბრანასთან, S-ნიტროზილირებას შეუძლია შეამციროს მემბრანისთან ასოცირება. გარდა ამისა, S-ნიტროზილირებული ან სულფონირებული ცისტეინის ნაშთები შეიძლება რეაგირებდნენ გლუტათიონთან (Martinez-Ruiz and

Lamas, 2007), მაგრამ გაურკვეველია SNO-ცილები წარმოადგენენ თუ არა შუალედური პროდუქტებს ცილების გლუტათიონილირებისთვის in vivo.

1.6 S-ნიტროზილირების როლი სხვადასხვა ცილების რეგულაციაში

დადგენილია, რომ ფოსფატაზა (PTEN - ფოსფატაზა და ტენზინის ჰომოლოგი) წარმოადგენდნენ სიმსივნის სუპრესორებს, ვინაიდან ისინი ანტაგონისტურად მოქმედებენ ონკოგენურ ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზა (PI3K)/პროტეინკინაზა B (PKB ან Akt) გზაზე, ფოსფატიდილინოზიტოლ (3,4,5)-ტრიფოსფატის დეფოსფორილირების გზით. აქედან გამომდინარე, თავის ტვინში PTEN-ის ინაქტივირებამ შესაძლოა ხელი შეუწყოს გლიობლასტომების წარმოქმნას. თუმცა ახალი მონაცემებით PTEN-ს დაუნრეგულაციამ შესაძლებელია ნეიროპროტექტორული ეფექტი გამომჟღავნოს ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს. მაგალითად, ჰეტეროზიგოტური უჯრედები PTEN-ის არსებობისას უფრო რეზისტენტულები იყვნენ ოქსიდაციური სტრესის მიმართ, ვიდრე WT-უჯრედები. (Li et al., 2002). PTEN-ი S-ნიტროზილირება Cys83-უბანში აინჰიბირებს მის აქტივობას და აძლიერებს ნეიროპროტექტორულ ეფექტს Akt სასიგნალო გზის მეშვეობით (Kwak et al., 2010; Numajiri et al., 2011). უფრო მეტიც, S-ნიტროზილირებული PTEN-ი სელექტიურად უბიქვითინირდება NEDD4-1-ის მეშვეობით და დეგრადირდება უბიქუიტინ-პროტეოსომული გზის მეშვეობით (Kwak et al., 2010). ნიტროზილირებამ შესაძლოა წარმოაჩინოს ნეგატიური უკუკავშირის მექანიზმი ნიტროზული სტრესის პირობებში, რომლის დროსაც NO-ს აქვს უნარი გაააქტიუროს Akt-გზა. Akt-ის S-ნიტროზილირებას შეუძლია დააინჰიბიროს იმ კინაზების აქტივობა, რომლებიც მოქმედებენ SNO-PTEN-ის ფორმირებაზე (Yasukawa et al., 2005; Numajiri et al., 2011; Banerjee et al., 2012). თუმცა, S-ნიტროზილირების ეფექტები, როგორც ერთი შეხედვით ჩანს, იწვევს PTEN/PI3K/Akt-გზის საწინააღმდეგო ეფექტს, ხოლო NO-ს მაღალი კონცენტრაცია ასევე ახდენს Akt-ის S-

ნიტროზილირებას და აინჰიბირებს ნეიროპროტექტორულ აქტივობას (Numajiri et al., 2011).

მიჩნეულია, რომ PTEN და სხვა თიროზინ ფოსფატაზული (PTP) ცილების წარმომადგენლები წარმოადგენენ S-ნიტროზილირების მნიშვნელოვან სუბსტრატებს იშემიური ინსულტის დროს (Shi et al., 2013). SNO-SHO-2-კავშირის ნიტროზილირება აბლოკირებს დაღმავალი გზების აქტივაციას, ამცირებს რა ERK1/2-ის აქტივაციას.

ცნობილია, რომ ციკლოქსიგენაზა (COX-2) წარმოადგენს ერთ-ერთ მთავარ პრეკურსორს ბიოლოგიური პროცესების დროს. დადგინდა, რომ ანთებითი პროცესის მიმდინარეობისას S-ნიტროზილირება ზრდის COX-2-ის აქტივობას (Kim SF et al., 2005), ისევე როგორც, ზრდის ფოსფოლიპაზა A2-ის (PLA2) აქტივობას (Xu L. et al., 2008), მაშასადამე, NO ორი გზით ზემოქმედებს პროსტაგლანდინების ბიოსინთეზზე. აქედან გამომდინარე, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ COX-2-ის და PLA2-ის S-ნიტროზილირება წარმოადგენს ერთ-ერთ ნეიროანთებით კომპონენტს ნეიროდეგენერაციის დროს.

1.7 S-ნიტროზილირება და მიტოქონდრიული დისფუნქციები

პათოლოგიური რედოქს რეაქციები იწვევს ჭარბი რაოდენობით NO-ს წარმოქმნას, რაც ხდება მიტოქონდრიული დისფუნქციის განვითარების მიზეზი, მიუხედავად იმისა, რომ მცირე რაოდენობით NO წარმოადგენს სასიცოცხლოდ აუცილებელ რეგულატორულ კომპონენტს მიტოქონდრიის აქტივობისათვის. აღწერილია ერთ-ერთი SNO-ცილა (SNO-Drp1) რომელიც გავლენას ახდენს მიტოქონდრიის ფუნქციონირებაზე ნეიროდეგენერაციული პროცესების მიმდინარეობის დროს. (Cho et al., 2009). პარკინის მიერ მიტოქონდრიული ცილების უბიქვითინირების შედეგად აქტიურდება მიტოფაგები და მცირდება ნერვულ უჯრედთა სიცოცხლისუნარიანობა (Youle and van der Bliek, 2012). იქიდან გამომდინარე, რომ პარკინის S-ნიტროზილირება არეგულირებს მის უბიქვითინ E3

ლიგაზურ აქტივობას, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ SNO-პარკინი გავლენას ახდენს მიტოფაგებზე დეგენერაციული პროცესების მიმდინარეობისას.

მიტოქონდრიის მთავარ ფუნქციას წარმოადგენს ჟანგვითი ფოსფორილირების გზით ატფ-ის სინთეზი. NO უარყოფით ეფექტს ახდენს მიტოქონდრიის რესპირატორულ აქტივობაზე სუნთქვითი ჯაჭვის I და IV კომპლექსების S-ნიტროზილირების გზით. (Cleeter et al., 1994; Clementi et al., 1998; Zhang et al., 2005; Dahm et al., 2006; Burwell et al., 2006). ასევე ნანახია, რომ NO უშუალოდ უკავშირდება I და II კომპლექსში, რკინა-გოგირდოვან ცენტრში არსებულ რკინას, ამცირებს ორივე კომპლექსში ელექტრონების ტრანსფერს და შესაბამისად ატფ-ის სინთეზს. (Drapier and Hibbs, 1988). იმის მიუხედავად, რომ არ არსებობს პირდაპირი მტკიცებულება SNO-მედიატორული ინჰიბირების კავშირის შესახებ მიტოქონდრიაში არსებულ კომპლექსებსა და ნეიროდეგენერაციას შორის, მაინც ხდება ამ მექანიზმის განხილვა ისეთი დაავადების დროს, როგორცაა პარკინსონიზმი (Brown and Borutaite, 2004). პარკინსონული მოდელის მქონე ცხოველებზე ჩატარებული ცდის დროს, ხდებოდა I კომპლექსის ინჰიბიტორის შეყვანა (მაგალითად MPTP ან როტენონი), რამაც გამოიწვია სხვადასხვა მახასიათებლების ცვლილება, მათ შორის დოფამინერგული ნეირონების დეგენერაცია, ალფა-სინუკლეარის დიდი ოდენობით წარმოქმნა და აგრეგაცია, (Beal MF, 2001; Betarbet R, et al., 2000). მიტოქონდრიაში არსებული სუნთქვითი ჯაჭვის კომპლექსების ინჰიბირებით S-ნიტროზილირების გზით შესაძლოა პოტენციურად ძლიერდება ROS/RNS წარმოქმნა, რაც ხდება ნერვული ქსოვილის დაზიანების მიზეზი. (Beal MF, 2001; Betarbet R, et al., 2000; Chung KK, et al., 2004; Uehara T, et al., 2006; Yao D, et al., 2004). კვლევის საგანი იყო სხვადასხვა გზების დადგენა, რომლებითაც შესაძლებელი იყო S-ნიტროზილირების გავლენის შესწავლა მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის რეგულაციაზე.

თავი 2. Ras-ის ბიოლოგიური მნიშვნელობა

2.1. Ras-ის სტრუქტურა და ბიოლოგიური მექანიზმი

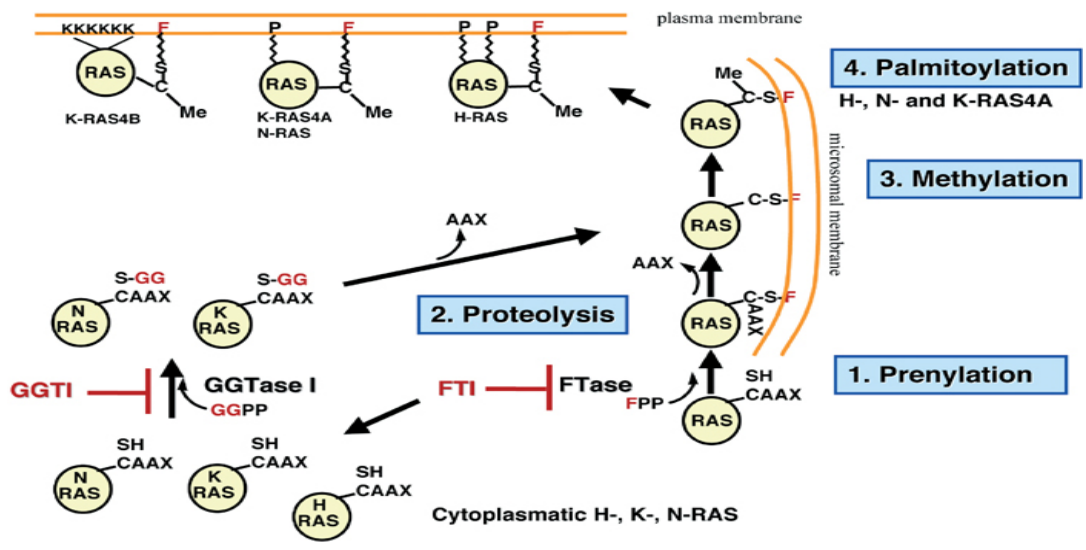
მცირე მოლეკულური მასის მქონე GTP-დამაკავშირებელი ცილები წარმოადგენენ მონომერულ G ცილებს მოლეკულური მასებით 20-40 კდა. მათი პირველი წარმომადგენლები H(Harvey)-Ras და K(Kirsten)-Ras გენები თავდაპირველად აღმოჩენილი იყო 80-იანი წლების დასაწყისში, როგორც სარკომის ვირუსების v-H-RAS და v-K-RAS ონკოგენები (Shih et al., 1978). მათი უჯრედული ონკოგენები იყო იდენტიფიცირებული ადამიანშიც და მათი მუტაციები ნანახი იყო ადამიანის კარცინომის ზოგიერთ ფორმაში (Der et al., 1982). როგორც შემდგომში აღმოჩნდა, ისინი მუტაციას განიცდიდა ადამიანის სიმსივნეთა თითქმის 30%-ში. (J Matthew Rhett et al., 2020) ეს მუტირებული ფორმები ასტიმულირებენ კულტივირებული უჯრედების პროლიფერაციასა და ტრანსფორმაციას, უფრო მეტიც, ისინი იწვევენ ნეირონული უჯრედების დიფერენცირებას.

ამჟამად, აღმოჩენილია 100-ზე მეტი მცირე G ცილა, რომლებიც იდენტიფიცირებულია ეუკარიოტებში, დაწყებული საფუარიდან დამთავრებული ადამიანებით, ისინი ქმნიან ერთ დიდ ზეოჯახს (Takai Y, et al., 1992). ამ ზეოჯახის წევრები კლასიფიცირდება 5 ოჯახში: Ras, Rho, Rab, Sarl/Arf და Ran ოჯახები. ამ ცილებს ახასიათებს GTP/GDP დამაკავშირებელი GTP-აზური აქტივობა, უმრავლეს შემთხვევაში GTP-აზური აქტივობა საჭიროა მცირე G ცილების ფუნქციის ტერმინაციისათვის და არ არის აუცილებელი თვით ამ ფუნქციის შესასრულებლად.

Ras პროტონკოცილის მაკოდირებელი გენი ერთ-ერთ ცნობილ პროტონკოგენს წარმოადგენს. მისი ცილოვანი პროდუქტი G ცილების ოჯახს მიეკუთვნება და გუანინის ნუკლეოტიდებს იკავშირებს. Ras წარმოადგენს GTP/GDP დამოკიდებულ ცილას, რომლის მოლეკულური წონა 21 კდ-ის ტოლია. იგი სუსტად

არის დაკავშირებული პლაზმურ მემბრანასთან ციტოპლაზმის მხრიდან და თავისუფლად სცილდება მასზე გარკვეული ზემოქმედებისას. იგი წარმოადგენს მაღალი ექსპრესიის მქონე ცილას განვითარებადი და ზრდასრული ორგანიზმის ნერვულ სისტემაში, მნიშვნელოვან როლს თამაშობს უჯრედის ზრდის ფაქტორებზე პასუხის წარმოქმნაში (Aktories et al., 1988; Albert et al., 1999). Ras ცილების აქტივაცია აუცილებელია იმ სასიგნალო გზებისთვის, რომლებსაც მივყავართ უჯრედის პროლიფერაციამდე. უფრო გვიან აღმოჩნდა, რომ Ras ცილები სავარაუდოდ მონაწილეობენ აპოპტოზისა და უჯრედული ციკლის რეგულაციის გზებში (Altschuler et al., 1993). Ras-ის ფუნქცია აუცილებელია ადრეული და გვიანი G₁ ფაზიდან S ფაზაში გადასვლისათვის (Altschuler et al., 1998).

Ras პროტონკოცია ფართოდაა გავრცელებული ძუძუმწოვართა უჯრედებში, მაგრამ მისი ექსპრესიის დონე შეიძლება იცვლებოდეს უჯრედების ტიპის მიხედვით. Ras ცილის ლოკალიზაცია უჯრედში დამოკიდებულია მისი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის ტიპზე. განარჩევენ რამოდენიმე ტიპის პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციას: პრენილირება, პროტეოლიზი, მეთილირება, პალმიტოილირება, ნიტროზილირება (სურათი 4).



სურათი 4. Ras ცილის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია: პრენილირება, პროტეოლიზი, მეთილირება, პალმიტოილირება. (Morgan, M, et al, 2003)

ამჟამად ცნობილია Ras პროტონკოცილის 3 ფორმა: H-Ras, K-Ras (K-Ras აქვს ორი იზოფორმა A და B) და N-Ras, რომელთა წერტილოვანი მუტაციები სავარაუდოდ ჩართულია ძუძუმწოვართა უჯრედების ტრანსფორმაციაში (Brown R, et al., 1984). მათი შესაბამისი გენებია H-ras, K-ras და N-ras, რომლებიც ექსპრესირდებიან სხვადასხვა ქსოვილსა და უჯრედებში განსხვავებული ინტენსივობით (Leon J. et al., 1987). Ras გენების მიერ კოდირებული პროდუქტი არის 188 ამინომჟავისგან შემდგარი ცილა (189 ამინომჟავა K-Ras(B)- შემთხვევაში). p21 ცილები, რომლებიც კოდირებულნი არიან ადამიანის სამი გენით, ჰომოლოგიურები არიან პირველი 164 ამინომჟავით, სადაც პირველი 86 N-ბოლოში იდენტურია, ხოლო შემდგომ 78-ში იდენტურობა 79%-ია. ისინი მთლიანად განსხვავდებიან C-ბოლოში განლაგებული 25 ამინომჟავით (ერთადერთი გამონაკლისია 189-ე ცისტეინი). ამიტომ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის 165-185 უბანს ჰეტეროგენული რეგიონი ჰქვია (Lowy D.R. et al., 1993). Ras-ის ბიოლოგიური აქტივობა ძირითადად განისაზღვრება მისი ეფექტორული დომენით (32-40), რომელიც იკავშირებს სხვადასხვა ეფექტორულ მოლეკულებს, თუმცა ხუთი ერთმანეთისგან დაშორებული სეგმენტი: 5-63, 77-92, 109-123, 139-165 და C-ტერმინალური CAAX-უბანი (Leon J. et al., 1987; Lowy D.R. et al., 1993.) აგრეთვე აუცილებელია Ras-ის ფუნქციონირებისათვის.

ამრიგად, უშუალოდ Ras-ის ოჯახის წევრები არიან: c-H-Ras, c-N-Ras, c-K(A)-Ras და c-K(B)-Ras და ისინი წარმოადგენენ ცენტრალურ მოლეკულურ გადამრთველებს, რომლებიც არეგულირებენ უჯრედში მრავალ ბიოლოგიურ პროცესებს (Shields J. M. et al., 2000; Barbacid M., et al., 1987).

Ras პროტონკოცილის როლის შესასწავლად მკვლევარების უმეტესობა იყენებს c-H-Ras იზოფორმას, როგორც „მოდელ“ Ras ცილას. გენეტიკურმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ემბრიოგენეზის პროცესში c-K-Ras-ის მაკოდირებელი გენების დათრგუნვა იწვევს ემბრიონულ ლეტალურ ფენოტიპს, რასაც ადგილი არა აქვს c-H-Ras-ის ან c-N-Ras-ის შემთხვევაში. ეს ფაქტი მიგვითითებს Ras-ის იზოფორმებს შორის ფუნქციურ სხვაობაზე (Esteban L. M. et al., 2001).

რაც შეეხება Ras ცილების სტრუქტურას, მათ აქვს GDP/ GTP დამაკავშირებელი უბანი და GTP-აზური აქტივობის მქონე უბანი, COOH ბოლოზე მდებარე უბანი, რომელიც განიცდის პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციებს ლიპიდებით (როგორცაა ფარნეზილირება, გერანილგერანილირება, პალმიტოილირება), აგრეთვე განიცდის მეთილირებას და პროტეოლიზს (Takai Y, et al., 2001). მოდიფიცირებული უბანი შეიცავს Cys-A-A-X თანმიმდევრობას, სადაც Cys-ცისტეინია, A-ალიფატური მჟავაა, ხოლო X- ნებისმიერი ამინომჟავა. ფარნეზილირება ხდება ცისტეინის ნაშთზე და A-A-X პროტეოლიზურად სცილდება, რის შედეგადაც გაშიშვლებული ცისტეინი განიცდის კარბოქსიმეთილირებას (Takai Y, et al., 2001). H-Ras ცილას აქვს დამატებითი ცისტეინის ნაშთი, რომელიც შემდგომ პალმიტირდება. Ras ცილების ლიპიდური მოდიფიკაციები აუცილებელია მისი მემბრანასთან და რეგულატორებთან დასაკავშირებლად და შესაბამისი დადმავალი ეფექტორების გასააქტივებლად (Magee A.I, et al., 1992).

Ras ცილას ორი ფუნქციური მდგომარეობა გააჩნია: GDP-თან დაკავშირებული (არააქტიური) და GTP-თან დაკავშირებული (აქტიური). როდესაც Ras-ის ცილოვან მოლეკულაში GDP იცვლება GTP-ით, იგი აქტიური ხდება.

აღმავალი ეფექტორებიდან სიგნალის მოსვლისას ხდება Ras-GDP-კომპლექსის დისოციაცია და ცილასთან GTP-ის დაკავშირება, რასაც მოჰყვება კონფორმაციული ცვლილება დადმავალი ეფექტორების დამაკავშირებელ უბნებში და იგი უკავშირდება შესაბამის დადმავალ ეფექტორებს, რაც თავის მხრიდან იწვევს ამ მოლეკულების ფუნქციების ცვლილებას. GTP-დაკავშირებული ფორმა მოლეკულის GTP-აზური აქტივობის წყალობით გადადის GDP-დაკავშირებულ ფორმაში, რომელიც შემდეგ ათავისუფლებს დადმავალ ეფექტორულ მოლეკულებს. ამ ერთი ციკლის შესრულებისას Ras ცილა გადამრთველივით გადასცემს სიგნალს უჯრედის შიგნით.

Ras-ის გააქტივება ხდება ადაპტორული SH2-დომენის მქონე ცილების საშუალებით, მაგრამ მათი მოქმედება არაპირდაპირია. ისინი ჯერ ე.წ. შუალედურ ცილებთან ურთიერთქმედებენ, ხოლო შემდეგ Ras-თან. ადაპტორულ ცილებს SH2

რეგიონის გარდა, მეორე სპეციფიკური უბანიც აქვთ. ეს უბანი დიდი რაოდენობით ამონომჟავა პროლინს შეიცავს და ამიტომ, მისი ალფა სპირალი გაშლილია. ამ უბნის მქონე ადაპტორული ცილები შუალედურ ცილას უკავშირდებიან და მხოლოდ ამის შემდეგ, Ras-ის მოლეკულას გადაეცემა კონფორმაციული ცვლილებები. შუალედურ ცილებს მიეკუთვნებიან: GRF, SOS, VAV და სხვა. ამრიგად, ყალიბდება რთული, ოთხი ცილისაგან შემდგარი კომპლექსი, რომლის აშენებაც რეცეპტორიდან იწყება და Ras-ით მთავრდება.

მას შემდეგ, რაც Ras ცილის GTP-დამაკავშირებელი ფორმა გამოავლენს თავის ეფექტს დადმავალ რეგულატორზე, იგი გარდაიქმნება GDP-დამაკავშირებელ ფორმად. მაგრამ, მექანიზმები რომელითაც ხორციელდება Ras ცილის სიგნალის დამთავრება ბოლომდე ცნობილი არ არის. Ras ცილების GTP-აზური აქტივობის სიჩქარე ასევე საკმაოდ დაბალია და თავის მხრივ, სტიმულირდება მეორე სახის რეგულატორული მოლეკულებით - GAP-ებით (GTP-ase activating protein), რომელთა უმრავლესობას აგრეთვე ახასიათებს სუბსტრატული სპეციფიკურობა ცილების ზეოჯახების მიხედვით.

ამგვარად, Ras ცილის აქტივობა რეგულირდება ორი ტიპის მოლეკულებით - GEF და GAP ცილებით, რომელთა აქტივაცია თავის მხრივ ხდება მრავალი უჯრედგარე სიგნალების საპასუხოდ. ერთ-ერთ ასეთ მექანიზმს წარმოადგენს თიროზინკინაზასთან ასოცირებული რეცეპტორის გააქტივება, რასაც მოჰყვება ადაპტორული ცილების (GRB2 და SHC/GRB კომპლექსის) თიროზინის ნაშთების ფოსფორილირება და Ras ცილის ყველაზე დამახასიათებელი გუანიდინის ნუკლეოტიდების ცვლის ფაქტორის SOS ცილის გადაადგილება ციტოზოლიდან. მემბრანასთან იქმნება რეცეპტორი-ადაპტორი-ცილოვანი ფაქტორის კომპლექსი, რომელიც ასტიმულირებს მემბრანასთან ასოცირებულ Ras-ის მოლეკულას და ააქტივებს მას (Takai Y, et al., 2001).

Ras ცილის აქტივაციის რეგულაციის ერთ-ერთ სავარაუდო გზად აგრეთვე შეიძლება ჩაითვალოს Ras-GRF მოლეკულის გააქტივება ლიზოზომოსფატიდური მჟავა

(LPA). LPA ზრდის Ras-GTP აქტიური ფორმის რაოდენობას უჯრედში. ნაჩვენებია, რომ ამ შემთხვევაშიც აუცილებელია კალმოდულინის და თავისუფალი Ca^{2+} -ის იონების არსებობა უჯრედში (Zippel R, et al., 2000).

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, Ras პროტონკოცილის აქტივაციის ხარისხის რეგულაცია აგრეთვე ხორციელდება NMDA ტიპის გლუტამატის რეცეპტორით და მასთან ასოცირებული მაღალმოლეკულური ცილოვანი კომპლექსის მეშვეობით GEF მოლეკულებზე მოქმედების გზით (Yun H.Y., et al., 1998).

Ras პროტონკოცილის რეგულაცია შესაძლოა ხდებოდეს GAP-ების საშუალებითაც. GAP მოქმედებს Ras-ის მოლეკულაზე, როგორც უარყოფითი რეგულატორი. ზოგიერთ შემთხვევაში GTP-აზის გამააქტივებელი ცილა ქმნის კომპლექსს თრომბოციტების ზრდის ფაქტორის (PDGF-platelet-derived growth factor) რეცეპტორთან, რომელიც თავის მხრივ თიროზინკინაზური აქტივობით აფოსფორილებს მას. GAP-ების როლი უჯრედის მეტაბოლიზმის რეგულაციის პროცესში ბოლომდე შესწავლილი არ არის. ცნობილია, რომ ამ ცილის გენის მუტანტები კვდებიან ემბრიოგენეზში, რაც შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ენდოთელური უჯრედების სისხლძარღვოვან ქსელში ორგანიზების უნარის მკვეთრი დარღვევებით და ნეირონების მასიური კვდომით.

ამრიგად, ოლიგომერის ფორმირების შემდეგ Ras-ის მოლეკულაში GDP-ი ჩაინაცვლება GTP-ით და აქტიურ მდგომარეობაში მყოფი Ras მოლეკულა ჩამოსცილდება კომპლექსს და მოქმედებას იწყებს ფერმენტთა სისტემაზე, რომელსაც ციტოპლაზმური პროტეინკინაზური კასკადი, ანუ მიტოგენებით აქტივირებადი პროტეინკინაზური (MAP) კასკადი ეწოდება. MAP-ის კასკადი უნიკალურ ურთიერთმაფოსფორილირებელი პროტეინკინაზების ჯაჭვს წარმოადგენს, რომელიც ციტოპლაზმაშია განთავსებული და რომლის გააქტივებაც მიტოზის ინიციაციასთან არის დაკავშირებული.

ამრიგად, Ras და მისი კასკადი უჯრედის ერთ-ერთ მთავარ რეგულაციურ სისტემას წარმოადგენს, რადგან მისი აქტივაცია უჯრედის ფუნდამენტურ ცვლილებებთან არის დაკავშირებული.

2.2. Ras-ის ფუნქცია უჯრედის რეგულაციურ პროცესში

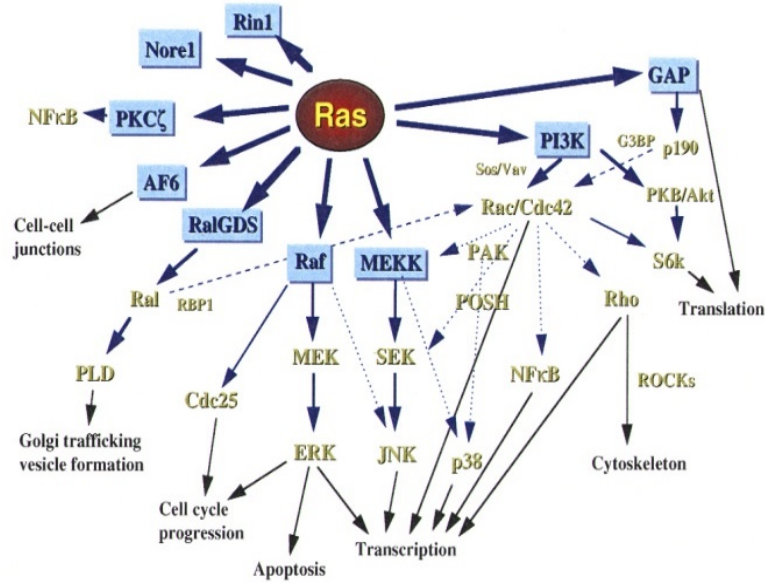
GTP-დამაკავშირებელი ცილები არეგულირებენ სხვადასხვა უჯრედშიდა პროცესებს. ექვგარეშეა, რომ Ras-ის სხვადასხვა იზოფორმები განაპირობებენ სხვადასხვა ბიოლოგიურ შედეგებს. რიგმა თანამედროვე კვლევებმა აჩვენა, რომ c-K-ras გენის პროდუქტი თამაშობს უფრო წამყვან როლს Rac-ის აქტივაციაში, ვიდრე Ras ცილის სხვა იზოფორმები (Voice J.K. et al., 1999). Rac წარმოადგენს GDP-დამაკავშირებელი ცილების ოჯახის წარმომადგენელს. იგი მონაწილეობს უჯრედის ძვრადობაში, მორფოლოგიურ ცვლილებებში და უჯრედის ორგანელების ტრანსლოკაციაში.

c-K-Ras-ის ზეექსპრესიის შედეგია რეაქტიული ჟანგბადის სახეობების (ROS) დონის დაბლა დაწევა H_2O_2 საპასუხოდ. ფიქრობენ, რომ ეს c-K-Ras სპეციფიური ეფექტი ვლინდება მაგნიუმ-დამოკიდებული სუპეროქსიდდისმუტაზას (Mn-SOD) რეგულირებით (Santillo M. et al., 2001). რადგანაც c-K(B)-Ras-ს აქვს რა კონტროლი Rac-GTP დონეზე, იგი არეგულირებს უჯრედების მიგრაციას (Voice J.K. et al., 1999).

სხვა *in vitro* კვლევები გვიჩვენებენ, რომ ონკოგენური c-H-Ras და c-K(A)-Ras უფრო აქტიურნი არიან ადჰეზიური პოტენციალის მქონე უჯრედებში, მაშინ როცა c-K(A)-Ras და c-N-Ras-ის ტრანსფორმირებული ფორმები უფრო მნიშვნელოვანნი არიან ადჰეზიისგან დამოუკიდებელი ზრდის ინდუცირებაში (Voice J.K. et al., 1999). ლიტერატურაში აგრეთვე არსებობს მონაცემები, რომ c-H-Ras ასტიმულირებს ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზას გააქტივებას და არის უფრო მეტად მგრძნობიარე GEF აქტივობის მიმართ, ვიდრე სხვა Ras ცილები. ონკოგენურ c-H-Ras

არ სჭირდება პირდაპირი ურთიერთქმედება სერინ-ტრეონინ-კინაზა Raf-1-თან ტრანსფორმირებული ფენოტიპის მისაღებად. ფაქტიურად, კონსტიტუციური მიტოგენ-აქტივირებადი პროტეინკინაზის (MAPK) მოქმედება ონკოგენურ c-H-Ras ტრანსფორმირებულ უჯრედებში, რომლებიც დამოკიდებულია ექსპრესირებული ონკოგენური c-H-Ras-ის რაოდენობაზე ხდება ნაწილობრივ იმის გამო, რომ c-H-Ras პირდაპირ ურთიერთქმედებს Raf-1-თან (Hamilton M. et al., 1998). ეს კიდევ ერთხელ ადასტურებს იმ მოსაზრებას, რომ ერთი ონკოგენური Ras ცილა ვერ შეცვლის Ras-იზოფორმების ფუნქციებს, რაც არ უნდა დიდი რაოდენობით მოხდეს მისი ექსპრესია.

Ras ცილები ახორციელებენ თავის ეფექტს უჯრედში ძირითადად სხვადასხვა პროტეინკინაზური კასკადების აქტივაციის გზით. ლიტერატურაში Ras პროტონკოცილის უშუალო დაღმავალ ეფექტორებს შორის მეტწილად მოიხსენიება Raf კინაზები (Raf1, B-Raf და A-Raf), PI-3K (ფოსფატიდილ-3-კინაზა) და GDS (გუანიდინის ნუკლეოტიდების დისოციაციის სტიმულატორები) ოჯახის წარმომადგენლები (Burns, 1998). გარდა ამისა, არსებობს გარკვეული მონაცემები იმის შესახებ, რომ Ras პროტონკოცილა მოქმედებს ისეთი მოლეკულების აქტივაციაზე, როგორებიცაა AF-6, Canoe, Rin-1, Nore-1, PKC და ფოსფოლიპაზა C (Takai Y, et al., 2001). Ras-ის მიერ სიგნალის უჯრედის შიგნით გადაცემა ძირითადად ხდება 3 ტიპის კასკადური გზით: Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt და SAPK/JNK (Wolfman C, et al., 2002). ეს უკანასკნელი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს N-Ras-ის აქტივაციით გამოწვეულ სასიგნალო პროცესებში (სურათი 5).



სურათი 5. Ras ცილის დადმავალი სასიგნალო გზა. (Malumbres M, et al., 1998)

პირველ სასიგნალო გზაში Ras პროტონკოცილის უშუალო ეფექტორს სავარაუდოდ Raf1 (მიტოგენ-აქტივირებული ცილის კინაზის კინაზის კინაზის MAPKKK ანალოგი) წარმოადგენს (Vojtek, et al., 1993), რომელიც თავის მხრიდან სერინის და ტრეონინის ფოსფორილირებით ააქტივებს MEK ცილას (MAPKK-ის ანალოგი), რაც საბოლოოდ იწვევს ERK (უჯრედგარე პასუხის კინაზის - extracellular response kinase) პროტეინკინაზას (MAPK) აქტივაციას ტრეონინის და თიროზინის ფოსფორილირების გზით. ERK პროტეინკინაზის დადმავალ ეფექტორებს მიეკუთვნება ზოგიერთი ტრანსკრიპციის ფაქტორი (CREB, Elk-1, c-Myc) და კალიუმის არხი KV4.2 (Sweatt, 2001).

ამგვარად, ERK სასიგნალო კასკადი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მრავალი უჯრედული პროცესის რეგულაციაში, მისი აქტივაცია საჭიროა სანგრძლივი პოტენციაციის და შესაბამისად მეხსიერების ჩამოსაყალიბებლად, ინსულინის მოქმედებით გამოწვეულ თიმიდინის და გლუკოზის მეტაბოლიზმის ცვლილებებში და სხვა.

Ras პროტონკოცილის მეორე დადმავალ სასიგნალო კასკადს წარმოადგენს PI-3K/Akt გზა, რომლის ამოქმედება იწყება PI-3K (ფოსფატიდილინოზიტოლ-3-კინაზას) აქტივაციით და 3-ფოსფოინოზიტების წარმოქმნით, რასაც მოჰყვება Akt

კინაზის PH დომენის მოდიფიკაცია და პლაზმურ მემბრანასთან მისი დაკავშირება (Meng et al., 2002).

Ras პროტონკოცილის მესამე დადმავალ გზას მრავალი ლიტერატურული მონაცემით წარმოადგენს JNK კასკადი. JNK (c-Jun N-terminal kinase) მიეკუთვნება სტრესით აქტივირებულ პროტეინკინაზას SAPK (stress-activated proteinkinase) და მონაწილეობს ნერვული უჯრედების დეგენერაციასა და აპოპტოზში (Li L, et al., 2004). არსებობს მონაცემები იმის შესახებ რომ, c-N-Ras ახორციელებს თავის ანტი-აპოპტოზურ ეფექტს JNK აქტივობის შესუსტების გზით (Wolfman C. et al., 2002). ბოლოდროინდელ მიღწევებს კლინიკურ კვლევებში ასპარეზზე გამოჰყავს ახალი იმედისმომცემი მედიკამენტები Ras-ის ინჰიბიტორების სახით, რაც კიდევ უფრო აძლიერებს მათი შესწავლის მნიშვნელობას. (J Matthew Rhett, et al., 2020)

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ძალიან საინტერესო ხდება იმ ნატიფი მექანიზმების დაწვრილებით შესწავლა, რომლებიც ახორციელებენ Ras პროტონკოცილის აქტივაციის რეგულაციას და სხვადასხვა დადმავალი ეფექტორული გზების ჩართვას სიგნალის გადაცემაში უჯრედის შიგნით.

2.3. Ras-ის ნიტროზილირება

Ras ცილის რეგულაცია ხორციელდება რიგი პოსტრანსლაციური მოდიფიკაციებით, რომელთა შორის აღსანიშნავია ნიტროზილირება, ფარნეზილირება, პალმიტირება და მეთილირება.

დაახლოებით ოცი წლის წინ აზოტის ოქსიდი (NO) იდენტიფიცირებული იყო, როგორც რელაქსაციური ფაქტორი. აზოტის ოქსიდი თავის ეფექტს ბიომოლეკულებზე ამჟღავნებს იმ უბნების პირადაპირი მოდიფიკაციით, რომლებიც მნიშვნელოვანია ცილის სტრუქტურისთვის ან ფერმენტული კატალიზისთვის. Ras-ცილა წარმოადგენს ყველაზე ხშირად მუტირებადი ონკოგენის ცილოვან პროდუქტს

და NO-ს მიერ S-ნიტროზილირების ერთ-ერთ სამიზნედ ითვლება. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ონკოგენური Ras ცილა GTP-დაკავშირებულ მდგომარეობაში იმყოფება და მუდმივად აქტიურია. Ras ცილის მოდიფიცირება NO-თი შესაძლებელია in vitro (Lander H. M. et al., 1995; Lander H. M. et al., 1998; Yun H.Y., et al., 1998). პირველად ლანდერმა (Lander H. M. et al., 1995) აჩვენა, რომ ადამიანის T-ლიმფოციტების NO-თი დამუშავება იწვევდა GTP-დამაკავშირებელი Ras ფორმის პროცენტულ ზრდას. in vitro ექსპერიმენტში ნანახია, რომ Ras პროტონკოცილა უფრო სწრაფად ცვლის გუანიდინურ ნუკლეოტიდებს NO-ს თანაობისას (Lander H.M. et al., 1995). მოგვიანებით აღმოჩნდა, რომ Ras-ცილის Cys-118 ნაშთი მოდიფიცირდება NO-თი. ნაჩვენებია, რომ ეს მოდიფიცირება მონაწილეობს Ras პროტონკოცილის მიერ გუანიდინის ნუკლეოტიდების ცვლის რეგულაციაში და აუცილებელია გადარჩენის სიგნალის აღძვრისთვის PC-12 უჯრედებში (Teng K.K. et al., 1999). რადგანაც, 118-ე ცისტეინის ნაშთები განლაგებული არიან იმ მარყუჟზე, სადაც გუანიდინური ნუკლეოტიდების დაკავშირება ხდება, ნავარაუდევია იყო, რომ ცისტეინის ეს მოდიფიკაცია უშუალოდ მოქმედებს Ras-ცილის GTP/GDP-ის ფარდობაზე და ამგვარად ცვლის მის აქტივობას (Pei E.F. et al., 1990). Ras-ცილას, 118-ე ცისტეინის გარდა აქვს ცისტეინის სამი სხვა ნაშთი, რომლებიც აგრეთვე შეიძლება მოდიფიცირდეს in vitro. რომელიმე ამ სხვა ცისტეინის მოდიფიკაციამ შესაძლოა ხელი შეუშალოს Ras-ის აქტივაციას 118-ე ცისტეინის მოდიფიცირების გზით, რადგანაც სხვა ცისტეინები მონაწილეობენ ცილის მემბრანაში ლოკალიზაციაში. ასე მაგალითად, Cys-181 და Cys-184 პალმიტირდებიან in vitro და ყველაზე C-ტერმინალური Cys-186 ფარნეზილირდება (Garcia A.M. et al., 1993).

აღსანიშნავია, რომ ნიტროზილირებას განიცდის, როგორც ციტოზოლური, ასევე უკვე მოდიფიცირებული, მემბრანასთან ასოცირებული მოლეკულა. ამჟამად, in vitro, აღმოჩენილია, რომ H-Ras-ზე პალმიტატის ჯგუფები განიცდიან მნიშვნელოვან მეტაბოლურ ცვლას და ეს ცვლა ძლიერდება ნიტროზული სტრესის პირობებში (Baker, 2000).

ასევე ნანახია, რომ NO და NO-ს წარმომქმნელი ოქსიდანტები ნერვულ უჯრედებში იცავენ ზოგიერთ ცილას პალმიტირებისგან (Hess DT. et al., 1993). ეს ეფექტი შეიძლება ახსნილი იყოს Cys-181, Cys-184, Cys-186 ნაშთების ნიტროზული აგენტებით პირდაპირი მოდიფიკაციის შედეგით, რომელიც ჩართულია პალმიტატების მეტაბოლიზმში (მაგალითად S-ნიტროზოცისტეინი).

უჯრედში თავისუფალი, აღდგენილი გლუტათიონის სიჭარბის გამო, ნებისმიერი მექანიზმი რომელიც გვაფიქრებინებს, რომ ცილა S-ნიტროზილირდება, შეიძლება აგრეთვე მივაწეროთ გლუტათიონის მონაწილეობას ოქსიდაციურ პროცესში (Thomas JA. et al., 1995). ცილებზე სხვადასხვა უბნები ამჟღავნებენ ოქსიდანტების მიმართ საკმაოდ განსხვავებულ რეაქტიულობას. ამის მსგავსად, სხვადასხვა ოქსიდაციურ ადუქტებს შეუძლიათ სხვადასხვა ეფექტის გამოწვევა, რაც დამოკიდებულია ზომაზე და მუხტზე.

2.4. Ras ცილის პალმიტირება

GTP დაკავშირების გარდა, Ras ცილა უნდა იყოს ასოცირებული უჯრედის მემბრანასთან იმისთვის, რომ მოახდინოს სიგნალების გადაცემა. მემბრანაში ჩართვა აადვილებს Ras-ის ორ კავშირს: GEF-თან და GAP-თან. მართლაც, Ras GEF კომპლექსი უშუალოდ რეგულირდება მათი ტრანსლოკაციით მემბრანაში მემბრანული დომენების გზით (SH2) ან მემბრანული ფოსფოლიპიდებით (PH). გააქტივებული Ras შესაბამისად მემბრანაზე ამაგრებს მის ეფექტორულ ცილებს. Raf-1 შემთხვევაში, მემბრანა თვითონ მონაწილეობს ამ კინაზის გააქტივებაში (Morrison DK, et al., 1997). ამრიგად, Ras არ არის Raf-1 კინაზის მხოლოდ ალოსტერული რეგულატორი, არამედ ამ ცილისთვის ლუზასაც წარმოადგენს (Leevers SJ., et al., 1994). Ras წარმოადგენს გლობულარულ, ჰიდროფილურ ცილას და მის მემბრანასთან ასოცირებას

უზრუნველყოფს მისი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციები, რასაც ადგილი აქვს უშუალოდ ტრანსლაციის შემდეგ.

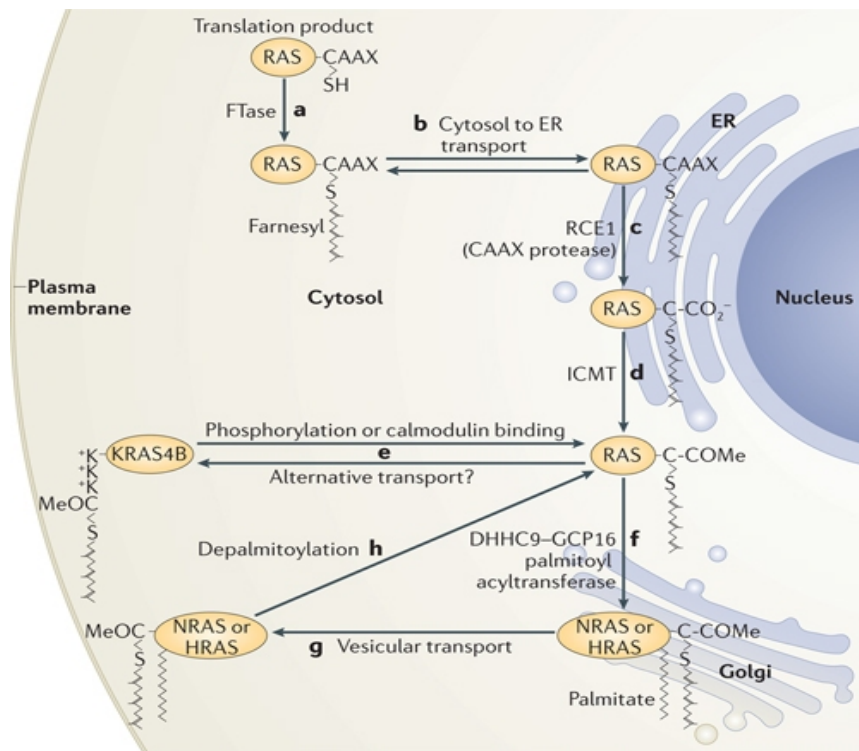
ფარნეზილირებისგან განსხვავებით, პალმიტირება წარმოადგენს შექცევად პროცესს ფიზიოლოგიურ პირობებში. ახალი მონაცემებით დადგენილია, რომ N-Ras და H-Ras განიცდიან აცილირება/დეაცილირებას, რაც დაკავშირებულია გოლჯის აპარატიდან Ras-ის გადაადგილებასთან (Goodwin JS, et al., 2005;). ამისთვის, საჭიროა პალმიტირება და ვეზიკულური ტრანსპორტი.

2.5. Ras ცილის შიდაუჯრედული გადასაწილება

არსებობს მონაცემები, რომლის მიხედვითაც Ras ცილები არიან მიტოქონდრიულ კომპარტმენტებში (Rebollo A. et al; 1999-b). ვიცით რა, რომ c-N-Ras ქმნის სტაბილურ ანტიაპოპტოზურ სიგნალს, უნდა ვიფიქროთ, რომ მიტოქონდრიაში ლოკალიზებული c-N-Ras ემსახურება უჯრედის გადარჩენის სიგნალს (Wolfman J. C. et al., 2000). Ras-ის მრავალი ეფექტორია ნაპოვნი მიტოქონდრიულ ფრაქციებში (Peruzzi F. et al., 2001; Kharbanda S. et al., 2000). ბოლო მონაცემების მიხედვით, თუ ყველა არა, უმრავლესობა c-N-Ras-ისა ლატენტური კომპლექსის სახით Raf-1-თან და პროტეინკინაზა C-თან ერთად არის პლაზმურ მემბრანაში, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ კომპლექსები პასუხობენ MAPK-კასკადს (Hamilton M. et al., 2001). მიტოქონდრიულად დაკავშირებული c-N-Ras-ის დანიშნულებას, როგორც ჩანს, უჯრედული აპოპტოზის რეგულაცია წარმოადგენს.

ამრიგად, ყოველი Ras-იზოფორმა განლაგებულია უჯრედული კომპარტმენტის სხვადასხვა ადგილებში. Ras-ის თითოეულ იზოფორმაში ოდნავ განსხვავებულია COOH-ბოლოში არსებული პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციებიც, რაც წარმოქმნის Ras-ცილების ფუნქციურ სხვადასხვაობას (სურათი 6). ყველაზე ნათლად ამ სხვაობაზე მიუთითებს ის ფაქტი, რომ Ras-ის ყველა იზოფორმა, c-K(B)-Ras-ის

გარდა, განიცდის პალმიტირებას. პოლილიზინის ნაშთის თანმიმდევრობაში მიმდინარე პალმიტირება მიმართულებას აძლევს c-K(B)-Ras-ს მემბრანაში გადასადგილებლად (Chen Z. et al., 2000; James G.L. et al., 1995). გარდა ამისა, Ras-ის იზოფორმები განიცდიან ფარნეზილირებას, ანუ იზოპრენის ნაშთის ჩართვას ცილოვან მოლეკულაში. ამ ორი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციის შედეგად Ras ადჰეზირდება პლაზმურ მემბრანასთან. მემბრანასთან დაკავშირებული Ras გაცილებით უფრო მაღალ ბიოლოგიურ აქტივობას ამჟღავნებს, ამიტომ ფარნეზილტრანსფერაზას ინჰიბიტორები გადიან კლინიკურ აპრობაციას ზოგიერთი ტიპის დაავადებების თერაპიაში გამოსაყენებლად (Overmeyer J.H. et al., 1998).



სურათი 6. Ras ცილის გადანაწილება შიდაუჯრედულ სტრუქტურებზე. (Philips, M., 2015)

სიმსივნური და ნორმალური უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმსა და რედოქს სტატუსს შორის განსხვავებების დადგენა წარმოადგენს კვლევის მნიშვნელოვან სფეროს, რომელიც დიდ ყურადღებას იქცევს ბოლო წლებში. ჟანგვითი ფოსფორილირება მიტოქონდრიაში და გლიკოლიზი ციტოზოლში წარმოადგენენ

ატფ-ის წარმოქმნის მთავარ მეტაბოლურ გზებს ძუძუმწოვრებში. ფიზიოლოგიურ პირობებში ნორმალური უჯრედების უმრავლესობა ატფ-ის წარმოსაქმნელად ძირითად წყაროდ იყენებს ენერგოფექტურ ჟანგვით ფოსფორილირებას. ხოლო სიმსივნური უჯრედების უმრავლესობა ატფ-ის წარმოსაქმნელად აქტიურად იყენებს გლიკოლიზურ გზას, ჟანგბადის არსებობის პირობებშიც კი. აერობული გლიკოლიზის დონის ზრდა სიმსივნურ უჯრედებში ცნობილია ვარბურგის ეფექტის სახელწოდებით (Warburg O., 1956). გარდა იმისა, რომ გლიკოლიზის დროს წარმოიქმნება ატფ-ის დიდი რაოდენობა, გლიკოლიზის დროს ხდება უჯრედების მომარაგება მეტაბოლიზმის შუალედური პროდუქტებით, რომლებიც გამოიყენება უჯრედის შემდგომი ზრდისა და გამრავლებისთვის (ნუკლეინის მჟავები, ცილები, ლიპიდები) (Vander Heiden MG. et al., 2009). გლუკოზის მოხმარების გაზრდა წარმოადგენს სიმსივნური უჯრედის მნიშვნელოვან მეტაბოლურ მახასიათებელს და ეს თავისებურება კლინიკური თვალსაზრისით ძალიან მნიშვნელოვანია, რადგან ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნეების უმრავლესობა ავლენს გლუკოზის მოხმარების მნიშვნელოვან ზრდას *in vivo* გარემოში, რაც ძალიან მარტივად დასტურდება ფლუოროდეოქსიგლუკოზის-პოზიტრონო-ემისიური ტომოგრაფიით (FDG-PET), იმეიჯინგ მეთოდი, რომელიც გამოიყენება სიმსივნის დიაგნოსტიკაში (Kaira K, et al., 2011). მიუხედავად ამ გრძელვადიანი განხილვებისა ვარბურგის ეფექტის ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები ჯერ კიდევ არ არის კარგად შესწავლილი. ზოგიერთი მოლეკულა, HIF-1 α , c-Myc, Akt, მნიშვნელოვან როლს თამაშობს გლიკოლიზის წარმართვაში და შესაბამისად ჩართულია სიმსივნური უჯრედების "მეტაბოლურ გადაპროგრამირებაში" (Vafa O, et al., 2002; Kim JW, et al., 2006). ცდებით დასტურდება ონკოგენური K-ras-ით გამოწვეული უჯრედების ონკოგენური ტრანსფორმაცია და მიტოქონდრიული სუნთქვის სუპრესია (Chiaradonna F, et al., 2006 a) ჟანგბადის რეაქტიული ფორმების წარმოქმნის გაძლიერება (Chiaradonna F, et al., 2006 b) თუმცა გაურკვეველი რჩება მექანიზმები, რომლითაც Ras ცილა იწვევს მიტოქონდრიის

დისფუნქციას, შესაბამისად ცვლის რედოქს სტატუსს და ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმს.

ტეტრაციკლინით ინდუცირებული მოდელის გამოყენებით ნანახია, რომ მუტირებული K-rasG12V-ის გააქტივება იწვევს მიტოქონდრიულ დისფუნქციებს, რომელიც საბოლოოდ აქვეითებს სუნთქვას, ზრდის გლიკოლიზს და აძლიერებს რეაქტიული ჟანგბადის ფორმების წარმოქმნის დონეს. K-Ras ცილა ასოცირებულია მიტოქონდრიასთან და იწვევს სუნთქვითი ჯაჭვის I კომპლექსის სწრაფ სუპრესიას და მიტოქონდრიის ტრანსმემბრანული პოტენციალის დაქვეითებას ციკლოსპორინ-მგრძნობიარე განვლადი ტრანზიტორული ფორის ცვლილების გზით. გარდა ამისა, K-rasG12V-ის ექსპრესიის წინასწარ *in vitro* გააქტივება, რომელიც უზრუნველყოფს მეტაბოლურ ადაპტაციას მაღალ გლიკოლიზურ მეტაბოლიზმთან, აძლიერებს ტრანსფორმირებული უჯრედების მიერ *in vivo* სისმსივნის წარმოქმნის უნარს. ჩატარებული კვლევები მიუთითებს იმაზე, რომ მიტოქონდრიული დისფუნქცია წარმოადგენს მნიშვნელოვან მექანიზმს, რომლითაც ტრანსფორმირებული K-rasG12V იწვევს მეტაბოლურ ცვლილებებს და ROS სტრესს სიმსივნურ უჯრედებში და პროვოცირებს მის განვითარებას. (Yumin Hu, et al., 2012).

Ras ცილის მუტაცია ხდება უფრო მაღალი სიხშირით, ვიდრე სხვა ნებისმიერი ონკოგენის (Bos JL, 1989). ოთხი Ras ცილა წარმოიქმნება სამი Ras გენისგან, რადგან kras ლოკუსის ტრანსკრიპტი განიცდის ალტერნატიულ სპლაისინგს. იმის გამო, რომ Ras-დამოკიდებული სიმსივნის დროს, ყველაზე ხშირად მუტაციას განიცდის k-ras (Prior IA, et al., 2012-b), k-ras ცილის ეს უნიკალური თვისება შესაძლოა სასარგებლოდ გამოყენებულ იქნას ანტი-Ras თერაპიის განვითარებაში.

Ras ცილებს არსებითად ერთმანეთისგან განასხვავებენ C-ტერმინალური 23-24 ამინომჟავით, იგი წარმოადგენს ჰიპერვარიანებულ რეგიონს (HVRs), რომლითაც ხდება Ras ცილის მემბრანასთან დაკავშირება. ჰიპერვარიანებულ რეგიონში შედის C-ტერმინალური CAAX თანმიმდევრობა, რომელიც ფარნეზილირდება, პროტეოლიზით და კარბოქსილის ჯგუფის მეთილირებით (Wright LP, et al., 2006).

თუმცა, ეს მოდიფიკაციები არაა საკმარისი Ras ცილის მემბრანასთან დასაკავშირებლად (Choy E, et al., 1999). Ras ცილის ოთხი იზოფორმიდან, სამი ასევე მოითხოვს ჰიპერვარიაბელურ უბნებში ცისტეინის პალმიტილირებას. K-Ras4B ცილა არის უნიკალური Ras ცილებს შორის იმის გამო, რომ ის არ პალმიტირდება.

ჩვენს მიერ განხილულ ლიტერატურულ მონაცემებზე დაყრდნობით, შეგვიძლია აღვნიშნოთ Ras-პროტოონკოცილის უდიდესი როლი უჯრედის როგორც ნორმალურ, ასევე პათოლოგიურ პროცესებში. ამიტომ, ამ ცილის მოქმედების მექანიზმების დაწვრილებითი დადგენა მნიშვნელოვან კვლევის ობიექტს წარმოადგენს თანამედროვე მეცნიერებაში.

თავი 3. ჰიპოქსია და მისი როლი ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებში

3.1 აზოტის ოქსიდის როლი თავის ტვინში მიმდინარე ჰიპოქსია-იმემიურ პროცესებში

როგორც ცნობილია, თავის ტვინის ფუნქციონირება სრულად არის დამოკიდებული სისხლის მიწოდებაზე. (Hawkins R. et al., 1985) ამგვარად, სისხლის მიწოდების და ჟანგბადის ნაკლებობის დროს ენერჯის მარაგი ატფ-ის საჭირო ნიშნულის შესანარჩუნებლად საკმარისია მხოლოდ 1 წუთის განმავლობაში. (Lust W.D. et al., 1985) ვინაიდან ცერებრალური მეტაბოლიზმი დამოკიდებულია ჟანგბადისა და გლუკოზის უწყვეტ მიწოდებაზე, ასფიქსიის დროს არსებობს კომპენსატორული მექანიზმები, რომლის მეშვეობითაც თავის ტვინი ახერხებს შეინარჩუნოს ეს ბალანსი და ჰიპოქსიურ პირობებში ენერჯის მიწოდება განახორციელოს სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან ორგანოებთან. იმ შემთხვევაში, თუკი ასფიქსიური პერიოდი ხანგრძლივდება, თავის ტვინისათვის სისხლის ნაკადის

მიწოდება მცირდება, ვინაიდან ამ დროს უკვე კლებულობს გულის შეკუმშვების სიხშირე და სიძლიერე. ეს ფაქტი წარმოადგენს კრიტიკულ ზღვარს, რის შემდეგაც უკვე ვითარდება თავის ტვინის დაზიანება. (Revich, M. et al., 1972).

ზოგიერთი პათოლოგიური მდგომარეობის დროს შესაძლებელია nNOS-ის აქტივაციის შედეგად მოხდეს NO-ს ჭარბი ოდენობით წარმოქმნა, რაც წარმოადგენს ნეიროტოქსიკურ ცვლილებას და შესაძლოა გამოიწვიოს ნეიროდეგენერაციული დაავადებები. nNOS-ს აქტივაციის მექანიზმის გააქტივების ერთ-ერთ მიზეზად მოიაზრება გლუტამინის რეცეპტორის ჰიპერაქტივაცია, უფრო კონკრეტულად N-მეთილ ასპარტატის (NMDA) სუბტიპის ჰიპერაქტივაცია პოსტსინაფსურ ნეირონებში. რაც განაპირობებს უჯრედში თავისუფალი Ca^{2+} -ის რაოდენობის გაზრდას და nNOS-ს აქტივაციას. ვარაუდობენ, რომ ეს იწვევს შემდგომ მიტოქონდრიულ დისფუნქციებსა და უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობის შემცირებას. მრავალი სტიმული, მათ შორის ციტოკინ-მედიატორული გენის ექსპრესიის გააქტივება მჭიდრო კავშირშია iNOS ექსპრესიასთან გლიურ უჯრედებში, რაც იწვევს NO-ს ჭარბი და უკონტროლო რაოდენობით გამოთავისუფლების პროვოცირებას, რაც ხდება მიზეზი მეზობელი ნეირონების დაზიანებისა (Juan P Bolaños, 1999).

3.2 აზოტის ოქსიდის როლი იშემიის დროს. ნეიროპროტექტორი თუ ნეიროტოქსიური აგენტი?

კვლევების შედეგად დადგინდა, რომ NO შესაძლოა წარმოადგენდეს როგორც ნეიროტოქსიკურ, ასევე ნეიროპროტექტორულ აგენტს. მისი მოქმედება დამოკიდებულია იმ უჯრედების ტიპებზე, სადაც ხდება მათი გამოთავისუფლება. (ნეირონული, გლიური და ენდოთელური) და ასევე დამოკიდებულია მათი გამოთავისუფლების ხანგძლივობასა და სიძლიერეზე. შესაძლო განმარტება ამ ორი ურთიერთგამომრიცხავი მოქმედებისა შემდეგნაირია; იშემია-დამოკიდებული nNOS-

ს აქტივაცია ნეირონებში იწვევს მათ კვდომას, ხოლო eNOS-ს აქტივაცია ენდოთელურ უჯრედებში იწვევს ნეიროპროტექციას, გლუვი კუნთების რელაქსაციის და ვაზოდilatაციის ხარჯზე ზრდის თავის ტვინის იშემიურ უბანში სისხლის მიწოდებას. მომავლის კვლევების საგანს წარმოადგენს სელექციური nNOS ინჰიბიტორების გამოყოფა, რომლებიც გავლენას არ მოახდენენ ენდოთელიუმის ვაზოდilatაციაზე. ეს შესაძლოა გახდეს ერთ-ერთი თერაპიული სტრატეგია თავის ტვინის იშემიის პრევენციის კუთხით (Juan P Bolaños, 1999)

ზემოაღნიშნული პრობლემების აქტუალობიდან გამომდინარე მნიშვნელოვნად მივიჩნიეთ ჰიპოქსიურ პირობებში Ras ცილის პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაციების (პალმიტირების და ნიტროზილირების) მნიშვნელობის შესწავლა ნერვული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაში, ჰიპოქსიურ პასუხში და უჯრედულ ბიოენერგეტიკაში.

მეთოდოლოგია

დასახული ამოცანების შესასრულებლად კვლევის ობიექტად გამოვიყენეთ ფეოქრომოციტომას თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინოვანი შრის სიმსივნის, ფეოქრომოციტომას უჯრედული ხაზი, PC-12 უჯრედული ხაზი. ექსპერიმენტები ჩატარდა ორ ეტაპად:

ამოცანა I - მიზნად დავისახეთ S-ნიტროზილირებული H-Ras-ის უჯრედშიდა გადანაწილების და მიტოქნდრიულ მეტაბოლიზმზე ზემოქმედების შესწავლა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12-ში უჯრედებში ჰიპოქსიის პირობებში.

ამოცანა II - მიზნად დავისახეთ დაგვედგინა, აზოტის ოქსიდის დონორის, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის ეფექტი H-Ras-ის პალმიტირებაზე და შეგვესწავლა უჯრედული პასუხი ჰიპოქსიაზე დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

ექსპერიმენტის ორივე ეტაპისათვის გამოყენებული იქნა იდენტური გზით მიღებული უჯრედული ხაზი, ასევე იდენტური მეთოდოლოგიით განხორციელდა მემბრანული, ციტოპლაზმური და ბირთვული ფრაქციის მომზადება PC-12 უჯრედული ხაზიდან.

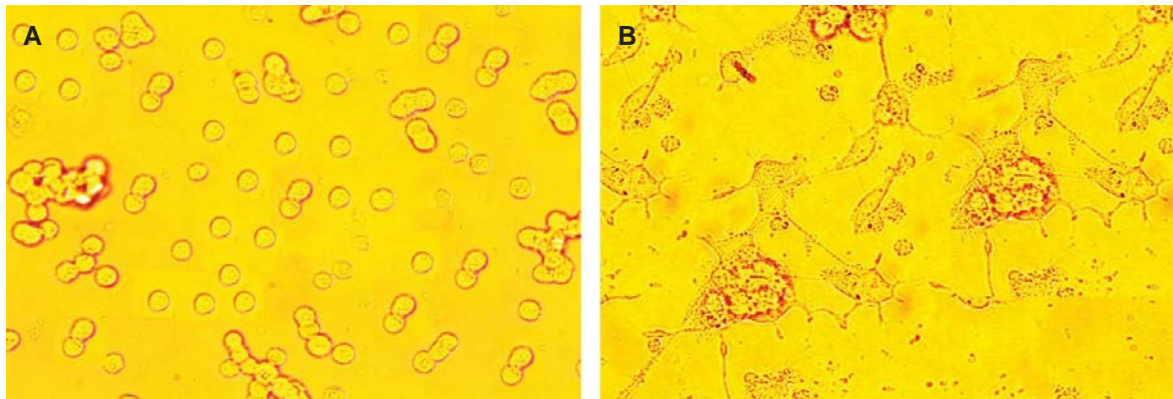
თავი 1. უჯრედული ხაზის მომზადება და ფრაქციონირება

1.1 *PC-12 უჯრედული ხაზის კულტივირება. დიფერენცირებული და არადიფერენცირებული PC-12 უჯრედების მიღება*

ექსპერიმენტებისათვის ვიყენებდით თავის თირკმელზედა ჯირკვლის ტვინოვანი შრის ფეოქრომოციტომას უჯრედულ ხაზს (PC-12, ATCC, CRL-1721). გაყინულ უჯრედებს ვაღობდით და ვთესავდით სპეციალურ პლასტიკურ კონტეინერში T25 (Greiner Bio-One GmbH, cat. no. 690 170). ინკუბაციას ვახდენდით 37°C ტემპერატურაზე და 5% CO₂ პირობებში გლუკოზის მაღალი კონცენტრაციის შემცველი დულბეკოს მოდიფიცირებულ იგლის არეში (DMEM, cat no. ATCC 30-2002) რომელიც გამდიდრებული იყო 10% ინაქტივირებული ცხენის შრატით, (HS, Sigma-Aldrich, cat no. H1138), 5% ჩანასახოვანი ხარის შრატით (FBS, Sigma-Aldrich, cat no. F2442) და 100-ერთ/მლ პენიცილინი და 50-მკგ/მლ გენტამიცინის სულფატით. (კონტამინაციის თავიდან აცილების მიზნით).

PC-12 უჯრედების დიფერენციაციისათვის ვაინკუბირებდით დაბალი კონცენტრაციის შრატის (1% HS and 1% FBS) შემცველ DMEM არეში, რომელსაც დამატებული ჰქონდა 100-ნგ/მლ ნერვული ზრდის ფაქტორი (NGF) (alomone labs, cat no. N-245) 35-მმ უჯრედული კულტურის თასებზე (Corning CellBIND ზედაპირით, cat no. 3294) 5 დღის განმავლობაში. NGF-ის შემცველ არეს ვუცვლიდით ყოველდღიურად. უჯრედს ვთვლიდით დიფერენცირებულად, თუკი მას ქონდა

ჩამოყალიბებული ერთი ან მეტი მორჩი, რომლის სიგრძეც აღემატებოდა უჯრედის დიამეტრის სიგრძეს. (სურათი 7)



სურათი 7. კულტივირებული PC-12 უჯრედები (Adh, ATCC® CRL1721.1™).

A. არადიფერენცირებული (ND) და B. დიფერენცირებული (D) ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედები. ND PC-12 უჯრედები ინკუბირებული იყო დაბალი კონცენტრაციის შრატის შემცველ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) არეში. რომელსაც დამატებული ჰქონდა ნერვული ზრდის ფაქტორი (NGF) 100 ნგ/მლ და ინკუბირებულ იქნა 5 დღის განმავლობაში. უჯრედები საკვლევად გამოყენებული იქნა 24 საათის შემდეგ, აღიბეჭდა ფოტოზე და გამოკვლეულ იქნა ნევრიტების არსებობაზე. თითოეული დამუშავების შემდგომ დავთვალეთ 100 უჯრედი 3 ცალკეულ ველში. უჯრედებს ჩაითვალნენ დიფერენცირებულად, თუ ისინი შეიცავდნენ ერთ ან მეტ მორჩს რომლის სიგრძეც აღემატებოდა უჯრედის სხეულის დიამეტრის სიგრძეს. წარმოდგენილი შედეგები არის 10 ერთმანეთისაგან დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული საშუალო \pm SD მაჩვენებელი. (Barbakadze et al., 2017)

უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის და რაოდენობრივი შეფასება ხდებოდა ტრიპან ლურჯი-საღებავით (Bio-Rad, cat no.145-0013) უჯრედების შეღებვით და ავტომატური უჯრედების მთვლელი აპარატის (TC 20™ (Bio-Rad, USA)) გამოყენებით. დიფერენცირებული და არადიფერენცირებული უჯრედები ვაინკუბირეთ 100მკლ SNP-იან და 100მკლ SNP-ის გარეშე არეში, ასევე 100- μ M 2-ბრომოპალმიტატი (2-BP)-იან და 100- μ M 2-ბრომოპალმიტატი (2-BP)-ის გარეშე არეში, როგორც ნორმოქსიის (N; 21% O₂), ასევე ჰიპოქსიის (H; 1% O₂) პირობებში 6 საათის განმავლობაში. ჰიპოქსიის (H; 1% O₂) პირობები შენარჩუნებული იქნა აზოტის აირის მეშვეობით CO₂-ინკუბატორში მოთავსებულ ჰიპოქსიურ კამერაში და

კონტროლდებოდა Proox Model 110 აპარატის მეშვეობით (BioSpherix, USA). ინკუბირებულ იქნა 5×10^6 უჯრედი თითოეული ნიმუშისთვის SNP-თან და 2-BP-თან.

1.2 მემბრანული, ციტოპლაზმური და ბირთვული ფრაქციის მომზადება PC-12 უჯრედული ხაზიდან.

6 საათის ინკუბაციის შემდეგ PC-12 უჯრედები მოვხსენით თევშიდან აფხეკვით და ანაფხეკი მასალა დავაცენტრიფუგირეთ $300 \times g$. ცენტრიფუგირების შემდგომ, PC-12 უჯრედები გავრეცხეთ ორჯერ რინგერის ხსნარით.

საბოლოოდ ინკუბირებული PC-12 უჯრედების რესუსპენზირება მოვახდინეთ სუბუჯრედული ფრაქციონირების ბუფერში (20 mM HEPES (pH=7.4), 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ეთილენგლიკოლი ტეტრამმარჟავა (EGTA), 250 mM საქაროზა, 1 mM დითიოტრეიტოლი (DTT) და პროტეაზების ინჰიბიტორების კოქტეილი (PI Cocktail III) (ყველა გამოყენებული რეაგენტი იყო მოწოდებული Sigma-Aldrich, USA-დან). უჯრედების ლიზისისთვის, მასალა გავატარეთ 25 G და 1 მლ-იან შპრიცში 10-ჯერადად. უჯრედების ლიზისის შემდგომ ბირთვები სედიმენტირდნენ ცენტრიფუგირების მეშვეობით $720 \times g$ -ზე 5 წუთის განმავლობაში, რის შემდგომაც მივიღეთ ბირთული ფრაქცია. (the post-nuclear) დარჩენილი სუპერნატანტი ვაცენტრიფუგირეთ $21\ 000 \times g$ -ზე 30 წუთის განმავლობაში. მიღებული ნალექი გამოვიყენეთ, როგორც მემბრანული ფრაქცია, ხოლო საბოლოოდ მიღებული სუპერნატანტი გამოყენებული იქნა, როგორც ციტოპლაზმური ფრაქცია, შემდგომში განხორციელებული ანალიზებისათვის.

მემბრანულ ფრაქციას დავამატეთ მემბრანული ლიზის ბუფერი (MLB) შემცველობით (1% IGEPAL CA-630, 50-mM Tris-HCl, 150-mM NaCl, and 10% glycerol, რომელშიც დამატებული იყო 50-mM N-ეთილმალეიმიდი). მას შემდეგ, რაც ვაინკუბირეთ $4^{\circ}C$ ტემპერატურაზე 30 წუთის განმავლობაში და დავაცენტრიფუგირეთ $21\ 000 \times g$ -ზე 60 წუთის განმავლობაში, მიღებული

სუპენატანტი გამოყენებული იქნა, როგორც *მემბრანული ფრაქცია*, შემდგომში განხორციელებული ანალიზებისათვის.

ბირთვული ფრაქცია გავრეცხეთ ერთხელ PBS ბუფერით, ვაცენტრიფუგირეთ 720×g-ზე 5 წუთის განმავლობაში, მიღებული ნალექი ვასუსპენდირეთ პროტეაზების ინჰიბიტორების შემცველ 1×RIPA ბუფერში 30 წუთის განმავლობაში ყინულზე შენჯღრევით ყოველ 10 წუთში. გაუხსნელი ნაწილი მოვამორეთ ცენტრიფუგირების მეშვეობით (60 წუთი 20000×g). მიღებული ექსტრაქტი გამოვიყენეთ როგორც ბირთვული ფრაქცია რაოდენობრივი განსაზღვრისას.

1.3 საქონლის თავის ტვინიდან მიტოქონდრიების გამოყოფა

ჩვენ გამოვიყენეთ პერკოლის უწყვეტი გრადიენტი, რათა გამოგვეყო არასინაპტოსომური მიტოქონდრია მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის თავის ტვინის ქერქიდან (Sims NR, et al., 2008). გამოვაცალკევეთ ტვინის ქერქი (80გ) და ერთხილად გავუკეთეთ ჰომოგენირება 10-ჯერ მეტ მოცულობა ჰომოგენიზაციის ბუფერში, რომელიც შეიცავდა (5mM HEPES, 225 mM მანიტოლს, 75 mM საქაროზას, და 1 mM EGTA, pH=7.5). მიღებული ჰომოგენირებული მასა დავაცენტრიფუგირეთ 1 250 x გ-ზე 5 წუთის განმავლობაში. მიღებული სუპერნატანტი დაუყოვნებლივ დავაცენტრიფუგირეთ 21 000 x გ-ზე 10 წუთის განმავლობაში და მოვახდინეთ მიღებული ნალექის რესუსპენდირება ცივ 15%-იან პერკოლის ხსნარში, მისი შემდგომი დაშრევებით 23% და 40% პერკოლის გრადიენტში. ნიმუშები დაცენტრიფუგირდა 35000 x გ-ზე 8 წუთის განმავლობაში. დაცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული ქვედა ინტერფაზა შევავროვეთ, გავრეცხეთ 2-ჯერ ჰომოგენიზაციის ბუფერში და მოვახდინეთ რესუსპენდირება ჰომოგენიზაციის ბუფერში EGTA-ს გარეშე. ეს მიტოქონდრიული ფრაქცია არ შეიცავდა Na,K-ATPase (პლაზმური მემბრანის მარკერი) აქტივობას. მთელი ექსპერიმენტი მიმდინარეობდა ყინულზე. ცხოველებთან დაკავშირებული ყველა პროცედურა დადასტურებული იყო

ი.ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ცხოველთა მოვლისა და გამოყენების კომიტეტის მიერ და ჩატარებული ევროპის საზოგადოებათა საბჭოს სახელმძღვანელოს შესაბამისად, დირექტივა 86/609/EEC.

თავი 2. უჯრედული ცილების ანალიზი

2.1. იმუნოპრეციპიტაცია.

მემბრანული ფრაქციების რესუსპენდირება ხდებოდა ყინულზე, სოლუბილიზაციის ბუფერში (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137mM NaCl, 10% გლიცეროლი, 1% Triton X-100, 2mM EDTA), დავაყოვნეთ 30 წუთი 4°C ტემპერატურაზე. არასოლუბილიზირებული მასალა მოვაცილეთ ცენტრიფუგირების გამოყენებით (60 წუთი 20,000×g-ზე). პლაზმური მემბრანის ფრაქციის ცილები და ციტოპლაზმური ფრაქციის ცილების თანაბარი რაოდენობა ვაინკუბირეთ anti-H-Ras პირველად ანტისხეულთან (Abcam, ab156784) 60 წუთის განმავლობაში, 4°C-ტემპერატურაზე, რომელსაც დავამატეთ A/Gცილა-აგაროზა (20 mkL თითოეულ ნიმუშში) და ვაინკუბირეთ მთელი ღამის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე მსუბუქი შენჯღრევით. მეორე დღეს გავრეცხეთ PBS ბუფერით სამჯერ 2 წუთიანი დაცენტრიფუგირებით 300g-ზე, ცილა/A/G-აგაროზის ნალექის შემდგომი რესუსპენდირებით 100 mM გლიცინთან pH 3.0 პირობებში, 10 წამის განმავლობაში. შემდგომ კი დავამატეთ 1.0-M Tris-ის წინასწარგანსაზღვრული მოცულობა, რომლის pH 9.5 იყო, და მივიყვანეთ pH 7.4-მდე. ზემოაღნიშნული პროცედურა ჩატარდა იმუნოპრეციპიტირებული ცილის A/G-აგაროზისგან და ანტისხეულისგან გამოყოფის მიზნით. იმუნოპრეციპიტირებული H-Ras გამოყენებულ იქნა ექსპერიმენტებში H-Ras-ის S-ნიტროზილირების და პალმიტირების რაოდენობრივი ანალიზისთვის, ასევე H-Ras-ის რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის.

2.2. ნიტროზილირებული H-Ras-ის დეტექცია.

S-ნიტროზილირებული H-Ras-ის განსაზღვრისთვის იმუნოპრეციპიტირებულ H-Ras-ში მოვახდინეთ S-ნიტროზილირებული ცილის განმსაზღვრელი კიტის გამოყენებით (Cayman Chemical, cat.: 10006518), ხოლო ბიოტინ-დაკავშირებული S-ნიტროზილირებული H-Ras-ის ანალიზი გაკეთდა ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდით იმუნომონიშნული სტრუქტავედინის-HPR გამოყენებით (Amersham Biosciences, UK კატ.ნომერი RPN1231V). მიღებული შედეგების ვიზუალიზაცია მოხდა გაძლიერებული ქემილუმინესენციის მეთოდით (ECL-ის) და გაანალიზდა დენსიტომეტრის გამოყენებით. H-Ras-ის საერთო რაოდენობა განისაზღვრა ნიტროცელულოზის მემბრანაზე გადატანისა და anti-H-Ras პირველად ანტისხეულთან (Abcam, dilution: 1:4000) ინკუბირების შემდეგ. მეორად ანტისხეულთან ინკუბირების შედეგად წარმოქმნილი იმუნოშეკავშირებული კომპლექსები ვიზუალიზდა გაძლიერებული ქემილუმინესენციის მეთოდით (ECL-ის) და გაანალიზდა დენსიტომეტრის გამოყენებით.

2.3. პალმიტირებული H-Ras დეტექცია.

პალმიტირებული H-Ras-ის დეტექცია მოხდა (Brigidi GS, et al., 2013)18-ის მიხედვით. მემბრანული ექსტრაქტი გამოყენებული იყო იმუნოპრეციპიტაციისთვის H-Ras პირველადი ანტისხეულთან (abcam, ab156784) (იხ, იმუნოპრეციპიტაცია). ზემოაღნიშნული ნიმუშები არ ვარესუსპენდირეთ 100-mM გლიცინთან, ვინაიდან ცილა გვჭირდებოდა შეკავშირებული A/G-აგაროზასთან. გამოყენებული იქნა ახალმომზადებული ჰიდროქსილამინის ბუფერი (1M HAM ბუფერი), როგორც ძლიერი აღმდგენი აგენტი ცისტეინის ნაშთებიდან პალმიტატის ჯგუფების

მოცილების მიზნით (specific cleavage and unmasking of the palmitoylated cysteine's thiol group), H-Ras მოლეკულაში პალმიტირებული ცისტეინების შემდგომი ანალიზისათვის.

საკვლევი ნიმუშები დაყოვნებული იქნა 1 საათის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. ინკუბაციის შემდგომ მოშორდა სუპერნატანტი და თითოეული ნიმუში ერთჯერადად გაირეცხა ყინულზე ლიზის ბუფერით (LB, pH6.2, ძალიან მნიშვნელოვანი ზუსტი pH-ის შენარჩუნება), უშუალოდ გამოყენების წინ მომზადდა ბიოტინ-BMCC-ის საწყისი ხსნარი (2,1მგ ბიოტინი-BMCC გახსნილი 0,5მლ დიმეთილსულფოქსიდი) იგივე ნაშთების თიოლ-რეაქტიული რეაგენტით, ბიოტინი-BMCC (Sigma Aldrich, cat no. B9181), საბოლოო კონცენტრაციით 5 μ M შემდგომი ბიოტინილირების მიზნით. თითოეულ ნიმუშის H-Ras/A/G-აგაროზას კომპლექსს დავუმატეთ ბიოტინი-BMCC ბუფერი (სამუშაო კონცენტრაცია 0.5 - 5 μ M) თავისუფალი ცისტეინის ნაშთებზე თიოლის ჯგუფთან შეკავშირების მიზნით და დავაყოვნეთ 1 საათის განმავლობაში 4°C ტემპერატურაზე. ინკუბაციის შემდეგ, თითოეული ნიმუში ერთჯერადად გაირეცხა ყინულზე LB-ით (pH 6.2). შემდგომ, ნიმუშები გარეცხილ იქნა სამჯერადად LB (pH7.2) + PMSF/PI. ზემოაღნიშნული გარეცხვის პროცესის მიმდინარეობისას, ყველა ნიმუში მოთავსებული იყო ყინულზე. შემდგომ, 2xნატრიუმის დოდეცილსულფატის (SDS)-ის საანალიზო ბუფერი მარედუცირებელი აგენტის გარეშე (5% SDS, 5% გლიცეროლი, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, და 0.01% ბრომოფენოლის ლურჯი) ახალმომზადებულ დითიოტრეიტოლთან ერთად დაემატა ნიმუშებს. ბიოტინი-BMCC დაკავშირებული პალმ-H-Ras-ის შემცველობა განისაზღვრა ელექტროფორეზით და ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდებით იმუნომონიშნული სტრუქტავიდინის-HPR გამოყენებით, ხოლო ვიზუალიზაცია მოხდა გაძლიერებული ქემილუმინესენციის კიტით (ECL, Santa Cruz Biotechnology, cat no. sc2048) და გაანალიზდა დენსიტომეტრის გამოყენებით.

2.4 SDS-PAGE ელექტროფორეზი და ვესტერნ-ბლოტინგი.

მემბრანულ ფრაქციაში ბიოტინილირებული ნიტროზილირებული H-Ras-ის და პალმიტირებული H-Ras ცილების, მემბრანულ და ციტოპლაზმურ ფრაქციაში ნიტროზილირებული H-Ras-ის და H-Ras-ის მთლიანი რაოდენობის განსაზღვრის მიზნით, ასევე ციტოზოლურ ფრაქციაში p-ERK/ERK თანაფარდობის დასადგენად და ბირთვულ ფრაქციაში HIF-1- α -ს განსაზღვრად, ცილის მთლიანი რაოდენობის გათვალისწინებით, ექსპერიმენტული ნიმუშების თანაბარი რაოდენობა ვადუღეთ 90°C-ზე 5 წუთის განმავლობაში 2x ნიმუშის ბუფერთან (Sample buffer), გავაციეთ და ვაცენტრიფუგირეთ 16,000xg-ზე 3 წუთის განმავლობაში, მოვახდინეთ ელექტროფორეზული დაყოფა SDS-PAGE-ის მეშვეობით 7,5-12% გელზე და დაყოფილი ცილები შემდგომი ანალიზისთვის გადავიტანეთ ნიტროცელულოზის მემბრანაზე. 5% ალბუმინის მეხუთე ფრაქციის და 0.05% Tween-20-ის შემცველ Tris-HCl-ბუფერში ბლოკინგის შემდგომ, ნიტროცელულოზური მემბრანები ვაინკუბირეთ პირველად ანტისხეულთან, რომელიც გახსნილი იყო 3% ალბუმინის მეხუთე ფრაქციის და 0.05%-იანი Tween-20-ის შემცველ Tris-HCl-ბუფერში. ERK პროტეინკინაზა-ს დეტექციისათვის ჩვენ გამოვიყენეთ ანტი-ERK პირველადი ანტისხეული (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-514302), p-ERK დეტექციისათვის ანტი-p-ERK პირველადი ანტისხეული (Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-7383), და HIF-1-alpha ანალიზისათვის გამოვიყენეთ ანტი-HIF-1-alpha პირველადი ანტისხეული (Abcam, ab179483). ინკუბაციის შემდეგ გაირეცხა სამჯერ 5-5 წუთის განმავლობაში და მოხდა შემდგომი 1 საათიანი ინკუბაცია შესაბამის მეორად ანტისხეულთან ან სტრეპტავიდინის-HRP-თან. იმუნომონიშნული ცილების ვიზუალიზაცია მოხდა გაძლიერებული ქემილუმინესენციის კიტით (ECL, Santa Cruz Biotechnology, cat no. Sc-2048) და გაანალიზდა დენსიტომეტრის გამოყენებით. მიღებული შედეგები შედარებული იყო მთლიანი ცილის რაოდენობასთან, რომელიც ისაზღვრებოდა

საღებავის-დაკავშირების მეთოდით (Bio-Rad). მემბრანადაკავშირებული H-Ras-ის და HIF-1-alpha-ს ექსპერიმენტებში Ponceau S-ით შექცევადად შეღებვა გამოიყენება, როგორც ცილის დატანის კონტროლი (მონაცემები ნაჩვენებია სურათი 13, გარდა აქტინისა) (Romero-Calvo I, et al., 2010). მემბრანები ინკუბირდა Ponceau S ხსნართან (P7170, Sigma-Aldrich) 7 წუთის განმავლობაში, ოთახის ტემპერატურაზე ნაზი შენჯღრევის პირობებში, გავრეცხეთ 2 წუთის განმავლობაში დეიონიზებული წყლით და შემდგომ ალვბეჭდეთ. ამის შემდგომ, ჩატარდა ზემოაღწერილი ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდი.

თავი 3. უჯრედული მეტაბოლიტების შეფასება

3.1 სუქცინატის რაოდენობრივი განსაზღვრა.

სუქცინის მჟავის რაოდენობრივი განსაზღვრა განხორციელდა ციტოპლაზმაში სუქცინატის რაოდენობრივი განსაზღვრის კიტით (კოლორიმეტრული მეთოდი) (cat#ab204718), სპექტროფოტომეტრის “Biotek ELx808” (USA) გამოყენებით, OD 450 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

3.2 უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა.

2-ბრომოპალმიტატის და SNP-ის ციტოტოქსიურობა შეფასებული იქნა ლაქტატდეჰიდროგენაზას გამოყოფით PC-12 უჯრედებიდან. LDH-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა მოხდა LDH რაოდენობრივი ანალიზის ტესტ-სისტემის გამოყენებით (Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit, Catalog number: 88954) “Biotek ELx808” (USA)-ის სპექტროფოტომეტრზე 490ნმ-დან 680ნმ-ტალღის სიგრძეზე. ზოგიერთ

ექსპერიმენტში უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა იზომებოდა ტრიპან ბლუს (ბიო-რადი) და ავტომატური უჯრედების მთვლელის TC 20TM(Bio-Rad) მეშვეობით, რათა დათვლილიყო ცოცხალი უჯრედების რაოდენობა და პროცენტული შემცველობა.

თავი 4. მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმის შესწავლა

4.1. H-Ras-ის ნიტროზილირება

ფუნქციურად აქტიური H-Ras და H-Ras^{V12} შექმნილ იქნა Jena Bioscience (გერმანია)-დან. Ras ცილების ნიტროზილირებისთვის გამოვიყენეთ შემდეგი პროცედურა (Williams JG, et al., 2003). 100 mM L-ცისტეინის 0,25M HCl-ში და თანაბარი mM NaNO₂ ერთნაირი თანაფარდობით შევურიეთ და ვაინკუბირეთ 10 წუთის განმავლობაში სიბნელეში, ოთახის ტემპერატურაზე. ინკუბაციის შემდგომ, მიღებული ნარევი განვაზავეთ 4:1 თანაფარდობით ბუფერში (20 mM Tris (pH=7.4), 1 mM დიეთილენტრიამინი პენტამარმჟავა), pH 7.4-მდე მივიყვანეთ NaOH-ით. 100-ჯერ მეტი S-ნიტროზოცისტეინი (0.1-1 mM) დავამატეთ H-Ras (25 µg) შემცველ სარეაქციო ბუფერში, რომელიც შეიცავდა 20mM Tris-(pH 7,4)/1 mM დიეთილენტრიამინის პენტამარმჟავას. მიღებული სარეაქციო ნარევი ინკუბირდებოდა 30 წუთის განმავლობაში სიბნელეში ოთახის ტემპერატურაზე. Sephadex G-50 (Pharmacia) გელზე ფილტრაციით ჭარბი დაბალმოლეკულური ნაერთების მოცილების შემდეგ, გასუფთავებულ ფრაქციას (საბოლოო კონცენტრაცია: 0,1 M) დაემატა მანიტოლი. შემდგომში ცილის შემცველი ფრაქცია შენახული იყო (25 მკგ/მლ) მცირე ულუფებად, ხშირი გაყინვა/გაღოლის თავიდან აცილების მიზნით.

4.2 მიტოქონდრიული H₂O₂ წარმოქმნის განსაზღვრა

მიტოქონდრიული H_2O_2 -ის დონე შეფასდა სკოპოლექტინის დაჟანგვის მეთოდით. ახლადგამოყოფილი მიტოქონდრიული ფრაქცია (100 μg of protein) წინასწარ ვაინკუბირეთ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ დიგიტონინთან (კონტროლი) და 2.5 μg H-Ras (როგორც ბუნებრივ, ისე მუტირებულ, ნიტროზილირებულ და არანიტროზილირებულ მდგომარეობაში) 5 წუთის განმავლობაში. შემდეგ, მიღებული ნარევი ვაინკუბირეთ 1მლ ბუფერთან, რომელიც შეიცავდა (10mM HEPES, 5mM $MgCl_2$, 2mM KH_2PO_4 , 250mM საქაროზა, 0.1% ხარის შრატის ალბუმინი (BSA), 1 IU/ml პირმუშხას პეროქსიდაზა (HRP), და 100nM სკოპოლექტინი). სუნთქვითი ჯაჭვის გასააქტიურებლად სუბსტრატებად გამოვიყენეთ 10 mM გლუტამატი და 5 mM მალატი. ფლოუროესენციის მონიტორინგი მიმდინარეობდა 460ნმ აღზნების და 540ნმ ემისიის ტალღის სიგრძეზე, 5 წუთის განმავლობაში. კალიბრაცია განხორციელდა H_2O_2 ცნობილი რაოდენობების დამატებით.

4.3 ATP-ის წარმოქმნა

ATP-ის წარმოქმნის შესაფასებლად გამოვიყენეთ ლუმინომეტრული მეთოდი. 0,1მგ/მლ ახლად გამოყოფილი მიტოქონდრია წინასწარ ვაინკუბირეთ 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ დიგიტონინთან (კონტროლი) და 2,5 μg H-Ras-თან (ბუნებრივი და მუტირებული, ნიტროზილირებული და არანიტროზილირებული) 3 წუთის განმავლობაში. შემდგომ დავუმატეთ სტანდარტული რესპირაციული (სუნთქვითი) ბუფერი შემდეგი შემადგენლობით: 10mM Tris-HCl (pH7.4), 0.32M მანიტოლი, 8mM არაორგანული ფოსფატი, 4mM $MgCl_2$, 0.08mM EDTA, 1mM EGTA, 0.1mM Ap5A და 0.2mg/ml ცხიმოვანი მჟავებისაგან თავისუფალი BSA. ჩვენ გამოვიწვიეთ ATP-ის წარმოქმნა 10 mM გლუტამატის, 5 mM მალატის, 5 mM სუქცინატის, და 1mM ადფ-ის დამატებით. 25°C ტემპერატურაზე 10 წუთიანი ინკუბაციის შემდგომ, მიმდინარე რეაქცია გავაჩერეთ 0.6 M ქლოროვანი მჟავის დამატებით, დავაყოვნეთ ყინულზე 10 წუთის განმავლობაში და დავაცენტრიფუგირეთ 15300 x g-ზე 5 წუთი. მიღებული

სუპერნატანტი გადავიტანეთ ცალკე ეპენდორფში და გავანეიტრალეთ 1 M KOH-ით. ATP რაოდენობრივად განისაზღვრა ლუციფერინის/ლუციფერაზას ანალიზის გამოყენებით (Sigma).

თავი 5. სტატისტიკური ანალიზი

სტატისტიკური ანალიზისთვის გამოიყენებოდა t-test ან one-way ANOVA მეთოდი. შედეგები მნიშვნელოვნად იქნა მიჩნეული * $P < 0.05$ -ზე. მიღებული მონაცემები დადგენილ იქნა სამი დამოუკიდებლად ჩატარებული ექსპერიმენტის მიხედვით.

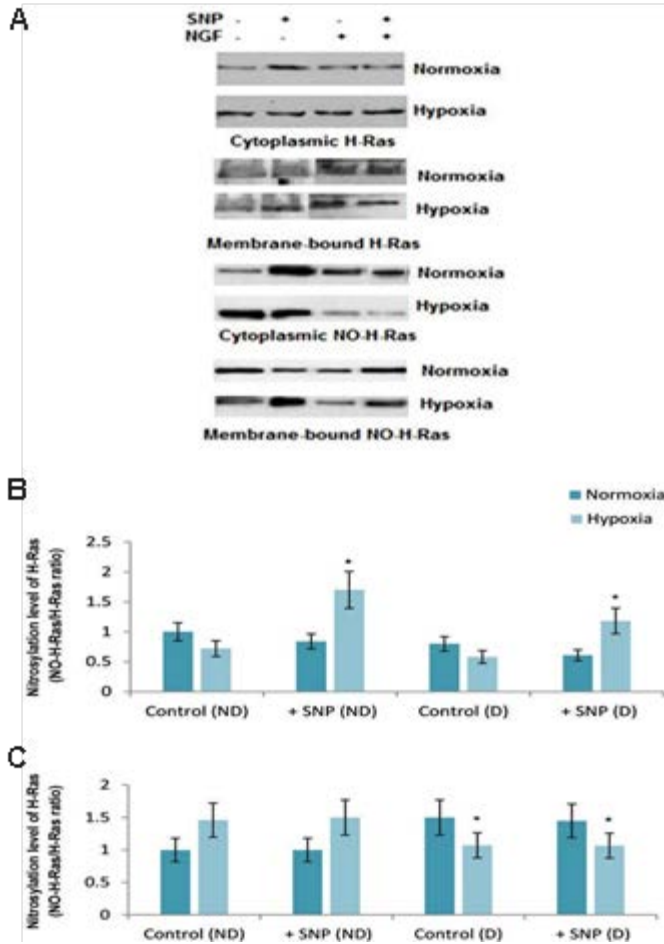
მიღებული შედეგები

თავი 1. S-ნიტროზილირებული H-Ras-ის უჯრედშიდა გადანაწილება დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC12 უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს

ჩვენ გამოვიკვლიეთ ჰიპოქსიის გავლენა H-Ras-ის ნიტროზილირებაზე. თავდაპირველად შევისწავლეთ D და ND PC-12 უჯრედები ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. შემდგომ, განვსაზღვრეთ H-Ras-ის მთლიანი შემცველობა მემბრანის და ციტოპლაზმური ცილების ფრაქციაში ვესტერნ-ბლოტის ანალიზით. დავადგინეთ, რომ ჰიპოქსიამ, თავისთავად, გაზარდა ციტოპლაზმური H-Ras-ის ექსპრესია და არ შეცვალა მემბრანასთან დაკავშირებული H-Ras-ის რაოდენობა ND უჯრედებში. თუმცა, NGF-ით დამუშავებულ D უჯრედებში, ჰიპოქსიამ გააძლიერა

ციტოპლაზმური და მემბრანა შეკავშირებული H-Ras-ის ექსპრესია (სურათი. 8A). აღსანიშნავია, რომ ND უჯრედების საინკუბაციო არეში SNP-ის დამატებამ, მნიშვნელოვნად გაზარდა ციტოპლაზმური H-Ras-ის ექსპრესია ნორმოქსიის დროს. ND უჯრედებში, მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის შემცველობა გაიზარდა SNP-ის თანაობისას და შემცირდა NGF-ით დამუშავებულ უჯრედებში ჰიპოქსიურ მდგომარეობაში.

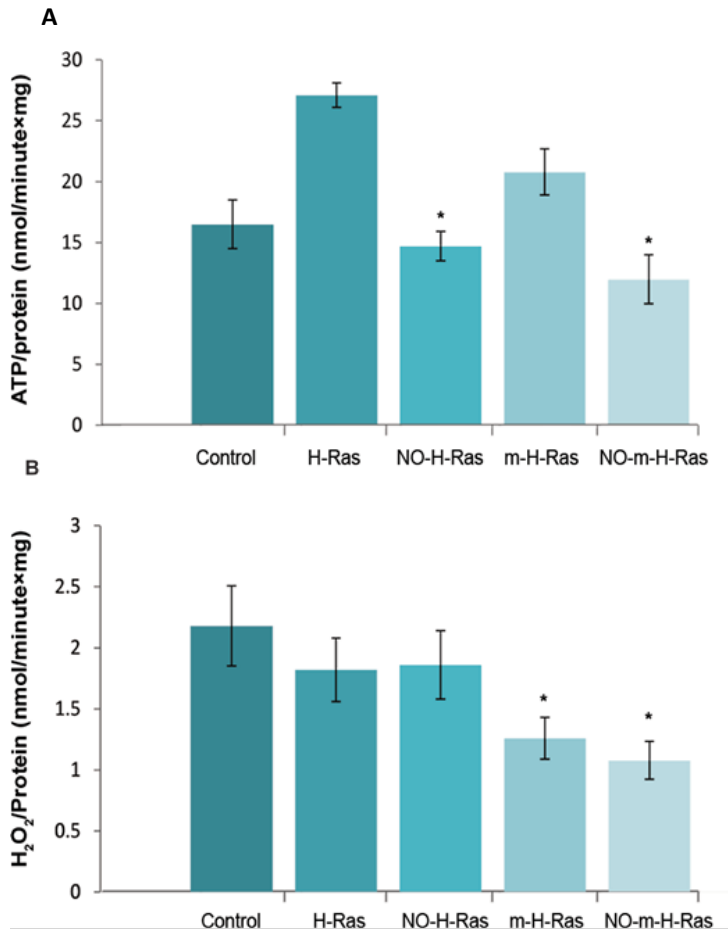
შემდეგ, განვსაზღვრეთ მემბრანა-დაკავშირებული და ციტოპლაზმური NO-H-Ras-ის დონეები ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში, უჯრედის ორივე ტიპში. აღმოჩნდა, რომ ჰიპოქსია განსხვავებულ გავლენას ახდენდა ციტოპლაზმური H-Ras-ის და მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის S-ნიტროზილირებაზე, ND და D უჯრედებში (სურათი 8A). H-Ras-ის სრული რაოდენობის დადგენის შემდგომ, შევამჩნიეთ, რომ მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ენდოგენური ნიტროზილირება არ შეცვლილა ჰიპოქსიის პირობებში, ND და D უჯრედებში (სურათი 8 B, C). თუმცა, აზოტის ოქსიდის დონორის, SNP-ის დამატებამ ND და D უჯრედებში მნიშვნელოვნად გაზარდა H-Ras-ის ნიტროზილირება ჰიპოქსიურ პირობებში. ჰიპოქსიამ შეამცირა ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირება D უჯრედებში, როგორც SNP-ის არსებობისას, ასევე მისი არარსებობისას, მაგრამ არ უმოქმედია H-Ras-ის ნიტროზილირებაზე ND უჯრედებში. ნორმოქსიის პირობებში, ნიტროზილირების დონე არ შეცვლილა უჯრედის არცერთ ტიპში.



სურათი 8. ციტოპლაზმური, მემბრანა შეკავშირებული H-Ras-ის და ციტოპლაზმური, მემბრანა შეკავშირებული ნიტროზილირებული H-Ras-ის (NO-H-Ras) საერთო ოდენობის განსაზღვრა დიფერენცირებულ (D) და არადიფერენცირებულ (ND) ფეოქრომოციტომის (PC-12) უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. მთლიანი ციტოპლაზმური და მემბრანასთან დაკავშირებული H-Ras-ის საერთო ოდენობის, აგრეთვე ციტოპლაზმური და მემბრანასთან დაკავშირებული ნიტროზილირებული-H-Ras (NO-H-Ras) ვესტერნ-ბლოტის ანალიზი დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. იმუნობლოტებისთვის, ცილის საერთო ოდენობიდან 50 მკგ თითოეული ფრაქციიდან შეტანილ იქნა თითოეულ კვილში, გაიხსნა ნატრიუმის dodecyl sulfate-polyacrylamide გელში ელექტროფორეზით, გადატანილ იქნა ნიტროცელულოზურ მემბრანებზე და გაანალიზებული იქნა anti-H-Ras-ით და biotin-streptavidin HPC NO-H-Ras-სთვის. ბლოტინგის დროს მიღებული შედეგები ეყრდნობა 3 მსგავსი ექსპერიმენტის დროს მიღებული შედეგების შემაჯამებელ მონაცემებს. NO-H-Ras-ის მიღებული მონაცემები ნორმალიზდა H-Ras საერთო ოდენობასთან მიმართებაში. მემბრანა-შეკავშირებული H-Ras. ხსნადი H-Ras. მნიშვნელოვნების დონე დაყენებული იყო * $P < .05$ და ექვემდებარებოდა შედარებას შესაბამისი კონტროლთან. (Barbakadze, T., et al., 2017)

როგორც ნორმალურ H-Ras, ისე მუტანტურ H-Ras^{V12} (m-H-Ras) შეუძლია უჯრედშიდა სტრუქტურებთან ურთიერთქმედება, მათ შორის მიტოქონდრიასთან,

რაც ცვლის ჟანგბადის მოხმარებას და იწვევს ROS-ის წარმოქმნას (Telang S, et al., 2007). ნიტროზილირებული H-Ras-ის მოქმედების შესასწავლად ჟანგვით მეტაბოლიზმზე, ჩვენ მიტოქონდრიებს დავამატეთ H-Ras და H-Ras^{V12}, ATP-ის სინთეზის და H₂O₂ წარმოქმნის დასადგენად (სურათი 9 A, B)



სურათი 9. ნორმალური H-Ras-ის, მუტაციური H-Ras^{V12}-ის (m-H-Ras), ნორმალური ნიტროზილირებული H-Ras-ის (NO-H-Ras) და მუტაციური ნიტროზილირებული H-Ras^{V12}-ის (m-NO-H-Ras) მოქმედება მიტოქონდრიების ოქსიდაციურ მეტაბოლიზმზე.

A. ცვლილებები ATP სინთეზში.

B. H₂O₂-ის წარმოქმნა თავის ტვინის მიტოქონდრიებში H-Ras, NO-H-Ras და m-H-Ras, NO-m-H-Ras ზემოქმედების შედეგად. ახლად იზოლირებული მიტოქონდრია ინკუბირებულ იქნა H-Ras, NO-H-Ras, m-H-Ras ან NO-m-H-Ras-თან. განისაზღვრა ატფ-ის და H₂O₂ წარმოქმნა. წარმოდგენილი მონაცემები არის დუბლიკატში ჩატარებული ოთხი ცალკეული ექსპერიმენტის შედეგების საშუალო ± SEM. (Barbakadze, T., et al., 2017)

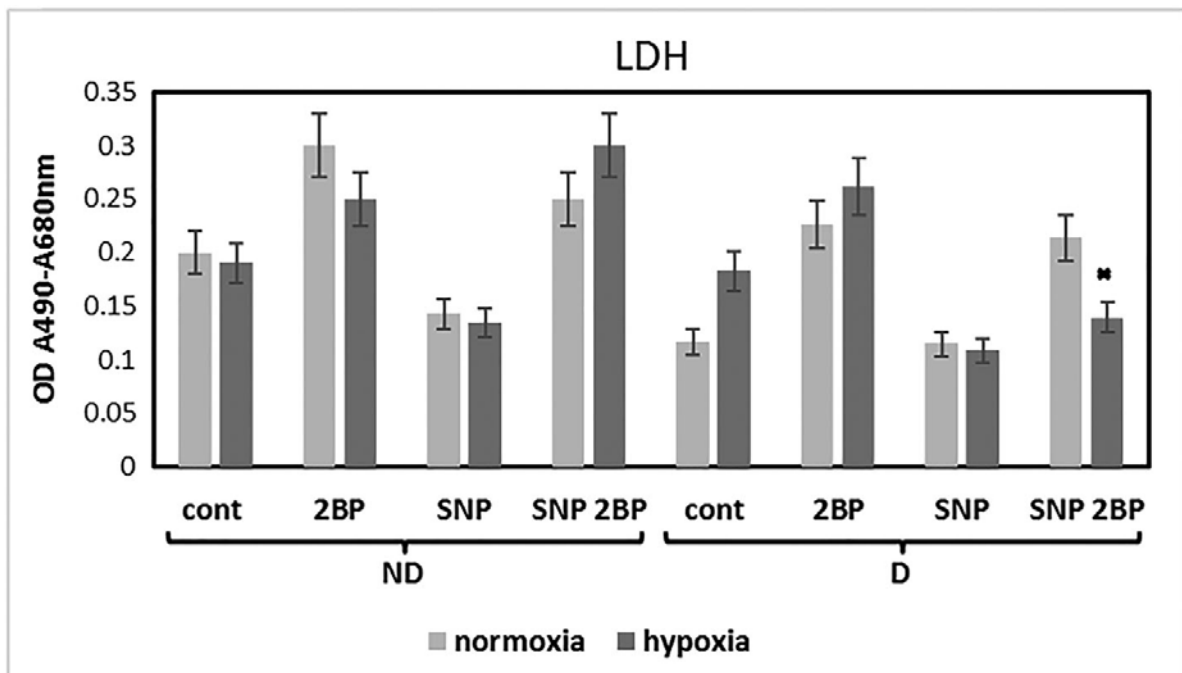
აღმოვაჩინეთ, რომ მიტოქონდრიებთან H-Ras ან H-Ras^{V12} დამატებამ გამოიწვია ATP სინთეზის გაზრდა, ხოლო მათი ნიტროზილირების შემდეგ მოხდა

ორივე ტიპის Ras-ის მასტიმულირებელი ეფექტების მოხსნა. საინტერესოა, რომ არც არამოდულირებულმა და არც ნიტროზილირებულმა H-Ras-მა არ შეცვალა მიტოქონდრიული H_2O_2 -ს წარმოქმნა. თუმცა, პეროქსიდების წარმოქმნა მნიშვნელოვნად შემცირდა მიტოქონდრებზე m-HRas^{V12}-ის დამატების შემდეგ. ამ შემთხვევაში, H-Ras-ის ნიტროზილირებამ არ იმოქმედა ROS-ის წარმოქმნაზე. ამ მონაცემების მიხედვით H-Ras-მა გაზარდა მიტოქონდრიული ATP-ის სინთეზი მხოლოდ არამოდულირებულ მდგომარეობაში და ცილის ნიტროზილირებამ აღმოფხვრა H-Ras-ის მასტიმულირებელი ეფექტი.

იმისათვის, რომ შეგვესწავლა ჰიპოქსიურ პირობებში აზოტის ოქსიდის დონორებისა და პალმიტოლირების ინჰიბიტორის გავლენა H-Ras-ის აქტივობაზე, ჩვენ გამოვიყენეთ არადიფერენცირებული (ND) და NGF-ით დიფერენცირებული (D) ვირთავის ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედები. პირველ რიგში, დიფერენცირებული და არადიფერენცირებული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა განისაზღვრა ნორმოქსიის და ჰიპოქსიურ პირობებში SNP-ის და 2BP-ის თანაობისას, ლაქტატდეჰიდროგენაზას რაოდენობრივი ანალიზის ტესტ-სისტემით. დადგინდა, რომ პალმიტირების დათრგუნვამ ნაწილობრივად გამოიწვია ციტოტოქსიურობა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, როგორც ჰიპოქსიის, ასევე ნორმოქსიის პირობებში. გარდა ამისა, ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიურ პირობებში, SNP არ ზრდის LDH-ის გამოყოფას, პირიქით, SNP თრგუნავს 2-BP-ის ციტოტოქსიურ ეფექტს ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში.

თავი 2. ნატრიუმის ნიტროპრუსიდი იწვევს H-Ras-ის დეპალმიტირებას და ცვლის უჯრედულ პასუხს ჰიპოქსიაზე დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC12 უჯრედებში.

იმისათვის, რომ შეგვესწავლა ჰიპოქსიურ პირობებში აზოტის ოქსიდის დონორებისა და პალმიტოლირების ინჰიბიტორის გავლენა H-Ras-ის აქტივობაზე, ჩვენ გამოვიყენეთ არადიფერენცირებული (ND) და NGF-ით დიფერენცირებული (D) ვირთაგვის ფეოქრომოციტომას (PC-12) უჯრედები. პირველ რიგში, დიფერენცირებული და არადიფერენცირებული უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა განისაზღვრა ნორმოქსიის და ჰიპოქსიურ პირობებში SNP და 2BP თანაობისას ლაქტატდეჰიდროგენაზას რაოდენობრივი ანალიზის ტესტ სისტემით. დადგინდა, რომ პალმიტირების დათრგუნვამ ნაწილობრივად გამოიწვია ციტოტოქსიურობა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, როგორც ჰიპოქსიის, ასევე ნორმოქსიის პირობებში. გარდა ამისა, ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიურ პირობებში, SNP არ ზრდის LDH-ის გამოყოფას, პირიქით, SNP თრგუნავს 2-BP-ის ციტოტოქსიურ ეფექტს ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. (სურათი 10.)

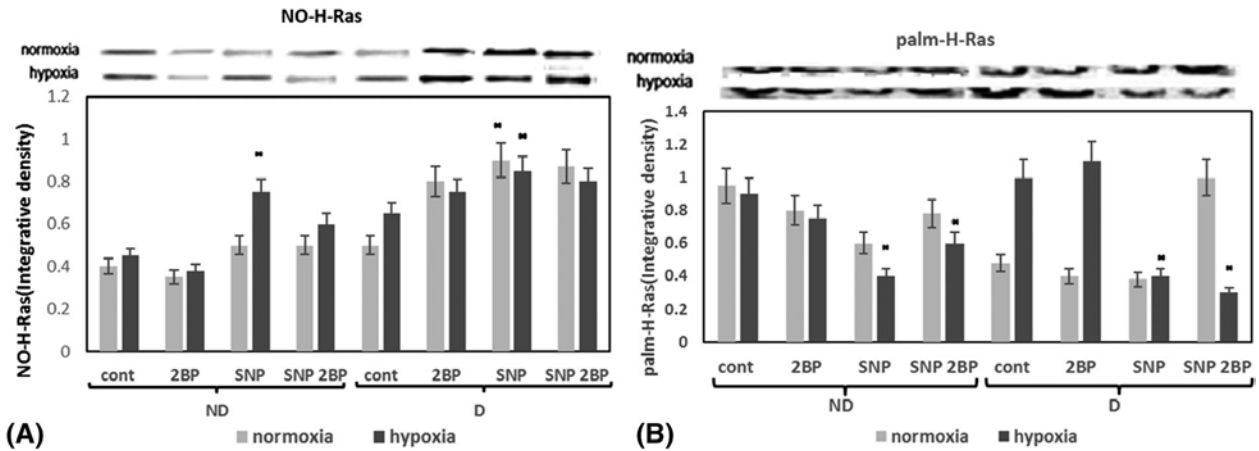


სურათი 10. ციტოტოქსიურობის განსაზღვრა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. გამოყოფილი ლაქტატდეჰიდროგენაზას (LDH) რაოდენობა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და

ჰიპოქსიურ პირობებში. ორ-ორი პარალელური ნიმუში იყო გამოყენებული და გამოთვლილი საშუალო მაჩვენებელი. (Goloshvili, G., et al., 2019).

ეს მონაცემები ადასტურებს Varga et al.-ის მიერ ჩატარებულ კვლევას, სადაც მითითებული იყო რომ, SNP-ის 100 μ M კონცენტრაცია დადებითად მოქმედებს უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე (Varga J, et al., 2016). გარდა ამისა, ეს მონაცემები მიუთითებს იმაზეც, რომ 2-BP-ით ფერმენტის დათრგუნვა იწვევს უჯრედების აპოპტოზს პროლიფერაციულ ნერვულ უჯრედებში (Wang C, et al., 2015).

გამომდინარე იქიდან, რომ H-Ras-ის ტერმინალური ცისტეინები გარკვეულ პირობებში შეიძლება იყოს ნიტროზილირებული ან პალმიტოლირებული, შემდგომ ეტაპზე განისაზღვრა ნიტროზილირებული მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras (Raines KW, et al., 2007). ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ნორმოქსიულ პირობებში, SNP არ ცვლის მემბრანა-დაკავშირებულ H-Ras-ის ნიტროზილირების ხარისხს არადიფერენცირებულ უჯრედებში, თუმცა ჰიპოქსიის პირობებში SNP მნიშვნელოვნად ზრდის ნიტროზილირებული მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის რაოდენობას. საინტერესოა, რომ დიფერენცირებულ უჯრედებში SNP ზრდის მემბრანასთან დაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირების დონეს, როგორც ჰიპოქსიურ, ასევე ნორმოქსიულ პირობებში, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ დიფერენცირებულ უჯრედებში არსებული H-Ras არის უფრო მეტად მგრძობიარე SNP-ის არატოქსიური კონცენტრაციით გამოწვეული ნიტროზილირების მიმართ და ნაკლებად მგრძობიარე რედოქს სტატუსის მიმართ, რაც იცავს მემბრანადაკავშირებულ H-Ras-ს ციტოზოლში ტრანსლოკაციისგან. (სურათი 11) დიფერენცირებულ უჯრედებში ნიტროზილირების მიმართ H-Ras-ის ეს მგრძობიარეობა შეიძლება იყოს შედეგი არადიფერენცირებულ უჯრედებთან შედარებით დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში შემცირებული საერთო რედოქს სტატუსით (Okouchi M, et al., 2005; Ekshyyan O, et al., 2005). (სურათი 11 A და B).



სურათი 11.

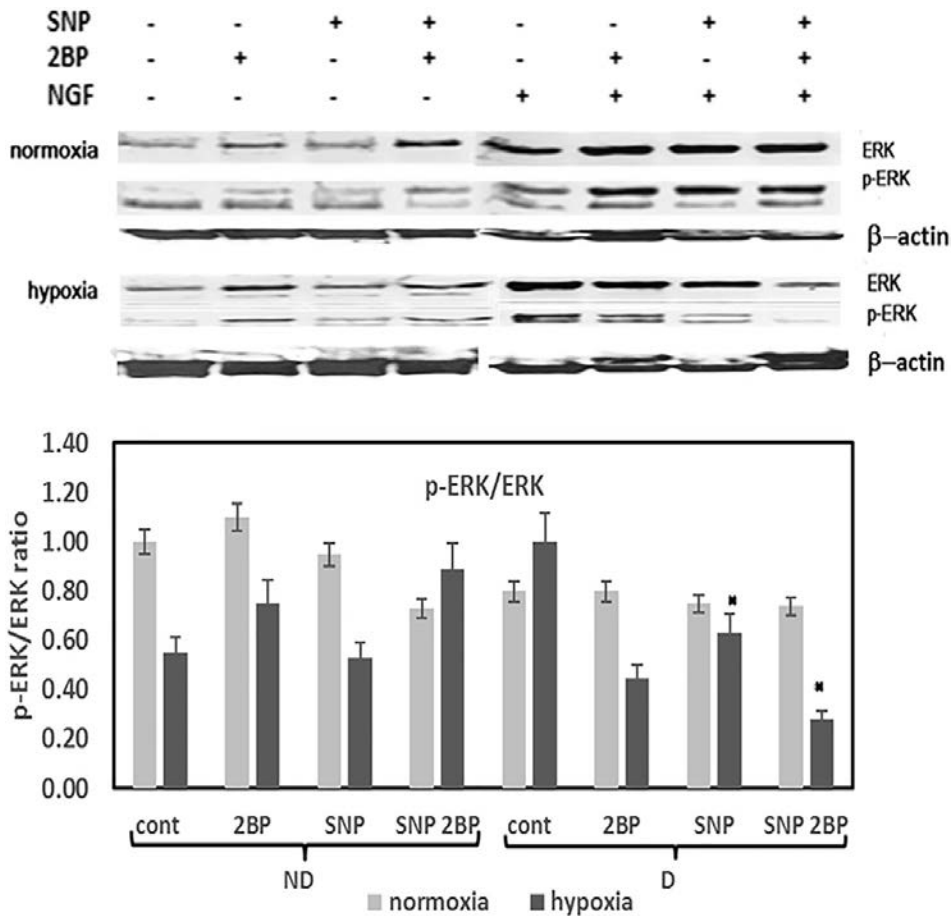
მემბრანა-დაკავშირებული *NO-H-Ras* და მემბრანა-დაკავშირებული *palm-H-Ras*-ის განსაზღვრა დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. A. მემბრანა-დაკავშირებული *NO-H-Ras*-ის იმუნობლოტინგი და სიმკვრივის დონე PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. B. მემბრანა-დაკავშირებული *palm-H-Ras*-ის იმუნობლოტინგი და სიმკვრივის დონე PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. იმუნობლოტებისთვის, ცილის სრული ოდენობის 50 მკგ თითოეული ფრაქციიდან შეტანილ იქნა თითოეულ კბილში. გაიხსნა ნატრიუმის dodecyl sulfate-polyacrylamide გელის ელექტროფორეზით, გადატანილ იქნა მემბრანებზე და გამოკვლეული ბიოტინ-სტრეპტავიდინ-HPC-ით ნიტროზილირებული და პალმიტირებული- *H-Ras* დამოუკიდებლად. ბლოტინგის დროს მიღებული შედეგები ეყრდნობა 3 მსგავსი ექსპერიმენტის დროს მიღებული შედეგების შემაჯამებელ მონაცემებს. მონაცემები ნორმალიზდება შექცევადი პონვო შედეგის მეთოდით. მნიშვნელოვნების დონე დაყენებული იყო * $P < .05$ და ექვემდებარებოდა შედარებას შესაბამისი კონტროლთან. (Goloshvili, G., et al., 2019).

აზოტის ოქსიდის დონორის, SNP-ის ეფექტების შესასწავლად პალმიტირებულ მემბრანა-დაკავშირებულ *H-Ras* რაოდენობაზე, ჩვენ განვსაზღვრეთ *H-Ras*-ის პალმიტირების ხარისხი SNP-ის თანაობისას.

ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ SNP მნიშვნელოვნად ამცირებს მემბრანა-შეკავშირებულ *H-Ras*-ის პალმიტილირებას ჰიპოქსიურ პირობებში, როგორც ND, ასევე D უჯრედებში, ხოლო ნორმოქსიურ პირობებში, SNP-ის ეფექტი უმნიშვნელოა (სურათი 11B). რადგან შემცირდა მემბრანა-შეკავშირებული *H-Ras*-ის პალმიტილირება ჰიპოქსიის პირობებში, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ მაღალი კონცენტრაციის აზოტის ოქსიდის, ჰიპოქსიის დროს წარმოქმნილ ჟანგბადის სხვა რეაქტიულ ფორმებთან ერთად შეუძლიათ *H-Ras* ცილაში პალმიტატის ჩანაცვლება.

ზემოაღნიშნული ცვლილებები დაფიქსირდა ორივე, პროლიფერილებულ და დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში.

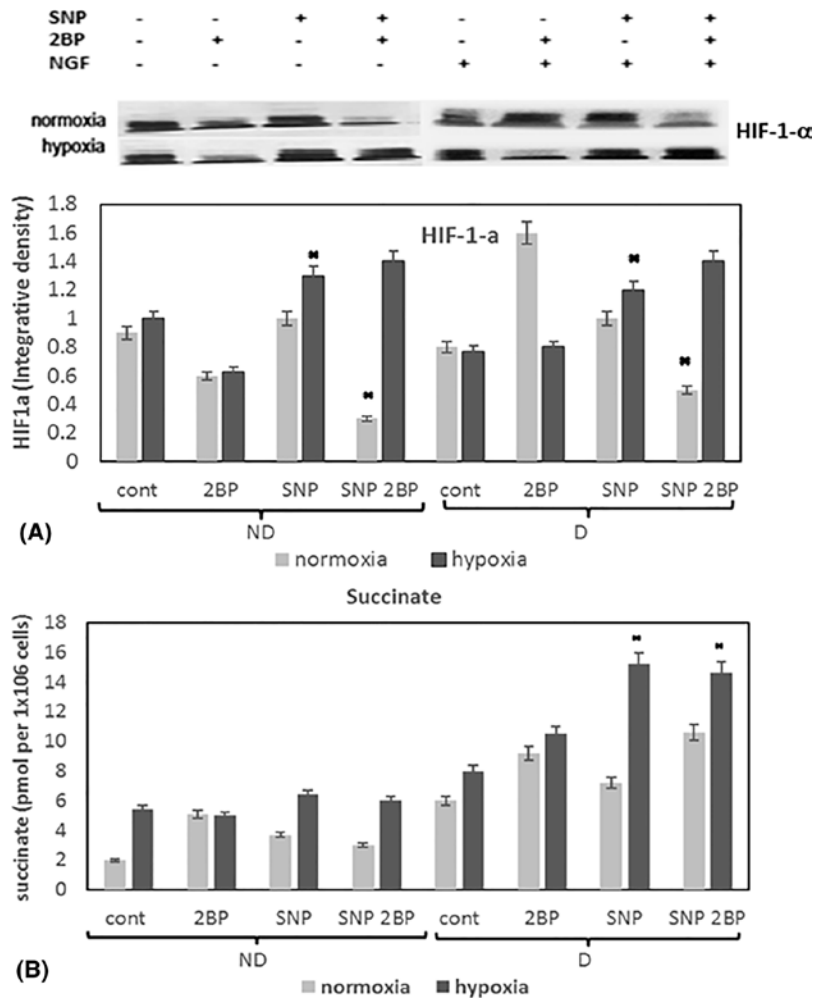
H-Ras-ის დაღმავალ ეფექტორებზე SNP-ის ეფექტის შესაფასებლად ჩვენ განვსაზღვრეთ ERK-ის აქტივობა. ვესტერნ-ბლოტის ანალიზმა აჩვენა, რომ ნორმოქსიულ პირობებში ERK-ის ფოსფორილირების დონე უფრო მაღალი იყო საკონტროლო ND-ში, ვიდრე D უჯრედებში (მაღალი თანაფარდობა p-ERK/ERK) და პირიქით, ERK-ის ფოსფორილირების დონე ჰიპოქსიის დროს იყო უფრო მაღალი საკონტროლო D უჯრედებში, ვიდრე არადიფერენცირებულ უჯრედებში. (სურათი 12) (მაღალი თანაფარდობა p-ERK/ERK). ამასთან, ERK-ის ფოსფორილირების დონე ჰიპოქსიურ პირობებში უფრო დაბალი იყო ND უჯრედებში, ხოლო ჰიპოქსიის ეს ინჰიბიტორული ეფექტი მოხსნილია D უჯრედებში. არც ნორმოქსიულ და არც ჰიპოქსიურ პირობებში, 2-BP-ით დამუშავებამ არ მოგვცა მნიშვნელოვანი ცვლილებები ERK-ს აქტივობის მხრივ ND და D უჯრედებში. SNP-ის თანაობისას ERK-ის აქტივობა მცირდება მხოლოდ ჰიპოქსიის პირობებში და მხოლოდ დიფერენცირებულ უჯრედებში. ERK-ის ფოსფორილირების ყველაზე მაღალი ინჰიბიტორული ეფექტი დაფიქსირდა, ჰიპოქსიის დროს უჯრედების თანადროული დამუშავებით როგორც SNP-ით, ასევე 2-BP-ით (Umbrello M, et al., 2013).



სურათი 12. ERK, p-ERK და β -აქტინის ანალიზი დიფერენცირებულ და არადიფერენცირებულ უჯრედებში, ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. ERK და p-ERK-ის იმუნობლოტინგი და სიმკვრივის დონე PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. მიღებული შედეგები ნორმალიზებული იყო β -აქტინთან შედარებით. მნიშვნელოვანი ცვლილება ჩაითვალია * $P < .05$ და შევადარეთ საკონტროლო ჯგუფთან. იმუნობლოტებისთვის, თითოეული ციტოპლაზმური ფრაქცია შეტანილ იქნა თითოეულ კბილში. გაიხსნა ნატრიუმის დოდეცილსულფატ-პოლიაკრილამიდის გელის ელექტროფორეზით, მოხდა გადატანა ნიტროცელულოზურ მემბრანაზე და გამოკვლეულ იქნა anti-ERK და anti-p-ERK ანტისხეულებით. თარიღები ნორმალიზებული იყო β -აქტინით დატვირთვით. (Goloshvili, G., et al., 2019).

Ras-ი და ჰიპოქსია, ორივე აქტიურებს ჰიპოქსიის გამომწვევ ფაქტორ-1-ალფას (HIF-1- alpha) (Sheta EA, et al., 2001). იმისათვის, რომ გამოგვეკვლია SNP-ის და 2-BP-ის ეფექტები H-Ras-დამოკიდებულ HIF-1-alpha აქტივაციაზე, ჩვენ განვსაზღვრეთ HIF-1-alpha-ს შემცველობა ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. ვესტერნ-ბლოტის ანალიზმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსია SNP-ის თანაობისას ზრდის HIF-1-alpha-ს ექსპრესიას, როგორც დიფერენცირებულ, ასევე არადიფერენცირებულ უჯრედებში. თუმცა, 2-BP-

ის თანაობისას, SNP-ის სტიმულატორული ეფექტები მოიხსნა მხოლოდ ნორმოქსიულ პირობებში. (სურათი 13).



სურათი 13. HIF-1-ალფას განსაზღვრა ბირთვში და სუქცინატის შემცველობის ანალიზი ციტოპლაზმაში არადიფერენცირებულ და დიფერენცირებულ D PC-12 უჯრედების ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. A. HIF-1-ალფას ვესტერნ-ბლოტის ანალიზი და სიმკვრივის დონის განსაზღვრა PC-12 უჯრედებში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. იმუნობლოტებისთვის, ცილის საერთო ოდენობიდან 20 მკგ თითოეული ფრაქციიდან შეტანილ იქნა თითოეულ კბილში, გაიხსნა ნატრიუმის dodecyl sulfate-polyacrylamide გელის ელექტროფორეზით, გადატანილ იქნა ნიტროცელულოზურ მემბრანებზე და გაანალიზებული იქნა ანტი-HIF-1-ალფა ანტისხეულით. ბლოტინგის დროს მიღებული შედეგები ეყრდნობა 3 მსგავსი ექსპერიმენტის დროს მიღებული შედეგების შემაჯამებელ მონაცემებს. მონაცემები ნორმალიზდება შექცევადი პონვო შედეგის მეთოდით. მნიშვნელოვნების დონე დაყენებული იყო * $P < .05$ და ექვემდებარებოდა შედარებას შესაბამისი კონტროლთან. B. სუქცინატის შემცველობის განსაზღვრა ND და D PC-12 უჯრედების ციტოპლაზმაში ნორმოქსიურ და ჰიპოქსიურ პირობებში. PC-12 უჯრედების ციტოპლაზმაში სუქცინატის შემცველობა განისაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით, როგორც აღწერილია მე-2 ნაწილში. (Goloshvili, G., et al., 2019).

უნდა აღინიშნოს, რომ ჰიპოქსიის პირობებში SNP-ის მოქმედების შედეგად HIF-1-alpha-ს მომატება, კორელაციაშია სუქცინის მჟავას მატებასთან, რომელიც არის HIF-1 – ალფა აქტივაციის მთავარი ინდუქტორი (Selak MA, et al., 2005). (სურათი 13 B). ამ შემთხვევაში, 2-BP მეშვეობით პალმიტირების დათრგუნვა, იმავდროულად ზრდის სუქცინატის შემცველობას არადიფერენცირებულ და დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში, როგორც ნორმოქსიურ, ასევე ჰიპოქსიურ პირობებში. ეს მონაცემები ადასტურებს, რომ ჰიპოქსიამ შეიძლება გამოიწვიოს HIF-1-alpha-ს ექსპრესია სუქცინატის რაოდენობის გაზრდის გზით. (სურათი 13 B). დიფერენცირებული უჯრედების საპირისპიროდ, არადიფერენცირებულ უჯრედებში, 2-BP-ით ინდუცირებული HIF-1-alpha-ს შემცირება არ კორელირებს სუქცინის მჟავის რაოდენობასთან. (სურათი 13 A და B).

მიღებული შედეგების განხილვა

აზოტის ოქსიდი მთავარ როლს თამაშობს ჰიპოქსიის დროს ქსოვილების ფუნქციონირების პროცესებში (Ho JJ, et al., 2012). მთავარი მექანიზმი, რითაც NO არეგულირებს ჰიპოქსიის სასიგნალო გზას, ისევე როგორც სხვა მრავალ უჯრედულ სამიზნეს, არის ცილების S-ნიტროზილირება (Foster MW, et al., 2003). მარეგულირებელი ცილების ფართო სპექტრის გარდა, ნანახია რომ იგი ურთიერთქმედებს Ras-თან და Ras-ის მსგავს GTP-აზებთან (Raines KW, et al., 2007). ჰიპოქსიურ პირობებში H-Ras აქტივირდება S-ნიტროზილირებით (Wainwright MS, et al., 2003), რაც იწვევს H-Ras-ის გადაადგილებას ციტოზოლში (Kim A, et al 2015).

Ras-ის მოდიფიცირება ნიტროზილირებით სხვადასხვა უჯრედშიდა კომპარტმენტებში არეგულირებს სხვადასხვა დადმავალ სასიგნალო გზებს, რომლებიც გავლენას ახდენენ უჯრედის ციკლზე, ზრდასა და აპოპტოზზე (Batista WL, et al. 2013). H-Ras-ის გადაადგილება და მდებარეობის შეცვლა რეგულირდება

ტერმინალური Cys181 და Cys184 ცისტეინის ნაშთების პალმიტირება/დეპალმიტირების მონაცვლეობით. ცისტეინის ეს ნაშთები წარმოადგენენ პოტენციურ დაკავშირების საიტებს S-ნიტროზილირებისთვის და შესაძლოა მოდიფიცირდნენ აზოტის ოქსიდის მაღალი კონცენტრაციისას (Mallis RJ, et al., 2001). აზოტის ოქსიდის რეაქტიულობა შესაძლოა გაიზარდოს ჰიპოქსიის პირობებში, რამაც შესაძლოა იმოქმედოს ტერმინალური ცისტეინის ნიტროზილირების პროცესებზე.

განვსაზღვრეთ NO-H-Ras-ის დონე ჰიპოქსიურ და ნორმოქსიურ პირობებში, არადიფერენცირებულ და ნერვული ზრდის ფაქტორით დამუშავებულ PC-12 უჯრედებში, ნატრიუმის ნიტროპრუსიდის თანაობისას, ან მის გარეშე. მიღებული მონაცემებიდან შეიძლება შემდეგი დასკვნების გამოტანა: მნიშვნელოვანი სხვაობა არ დაფიქსირებულა ციტოპლაზმური ან მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირებაში D და ND PC-12 უჯრედებს შორის ნორმოქსიურ პირობებში. ჰიპოქსიით გამოწვეული ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირების შემცირება არ ახდენს გავლენას მემბრანასთან დაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირებაზე. აღმოჩნდა, რომ ჰიპოქსიურ პირობებში ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირება მცირდება, როგორც SNP-ის არსებობისას, ასევე არარსებობის პირობებში, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ NO-ის კონცენტრაცია არ ზღუდავს ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირებას ჰიპოქსიურ პირობებში. PC-12-ის დიფერენციაციამ, ამ შემთხვევაში, არ იმოქმედა H-Ras-ის ნიტროზილირების პროცესზე. ეს მონაცემებზე თანხვედრაშია ადრინდელ კვლევასთან, რომელმაც გამოავლინა, რომ NO-ს არ შეუძლია H-Ras-დამოკიდებული სასიგნალო გზის გააქტიურება PC-12 უჯრედების დიფერენცირების დროს (Bátor J, et al., 2012). ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ჰიპოქსიურ პირობებში მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ენდოგენური ნიტროზილირება იყო უცვლელი. თუმცა, მისი ნიტროზილირების ხარისხი მნიშვნელოვნად გაიზარდა SNP-ის თანაობისას. ეს მონაცემები გვაძლევს საშუალებას

ვივარაუდოთ, რომ NO-ს მაღალმა კონცენტრაციამ შეიძლება შეცვალოს მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირების ხარისხი.

როგორც ჩანს, SNP-ის მიმართ მგრძობელობის სხვაობა მემბრანასთან დაკავშირებულ და ციტოპლაზმურ H-Ras-ს შორის, ჩვენს ექსპერიმენტში განპირობებული იყო ბაზალური აზოტის ოქსიდის სინთაზას (NOS) აქტივობით არადიფერენცირებულ და NGF-ით დამუშავებულ, დიფერენცირებულ უჯრედებში.

NOS-ის უჯრედშიდა მდებარეობა PC-12-ში იცვლება უჯრედული აქტივობის მიხედვით. უჯრედგარე სიგნალები PC-12 უჯრედებში იწვევს NOS-ის მდებარეობის ცვლილებას ციტოპლაზმიდან პლაზმურ მემბრანებში, სადაც ის შეიძლება იყოს ჩართული NMDA რეცეპტორთან კომპლექსში, როგორც მესამე წევრი (Arundine M, et al., 2003). მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras მდებარეობს ნეირონული NOS-თან (nNOS) მიმდებარედ. ამ შემთხვევაში S-ნიტროზილირების სიგნალის H-Ras-ზე გადაცემას მოკლე გზა სჭირდება (Martínez-Ruiz A, et al., 2013). NOS-ის არაინდუცირებული იზოფორმის უპირატესად პლაზმურ მემბრანაზე მდებარეობა წარმოქმნის NO-ს უფრო მაღალ დონეს. შესაბამისად, ამ კონკრეტულ ადგილზე ცილების ნიტროზილირება არის უფრო ეფექტური, ვიდრე უჯრედის მემბრანულ ორგანოებში. აქედან გამომდინარე, H-Ras-ის ცისტეინის ნაშთი შესაძლოა ოკუპირდეს NOS-ის აქტივობის შედეგად. PC-12 უჯრედებში NOS-ის სხვადასხვა უჯრედშიდა ლოკალიზაციამ და აქტივობამ შეიძლება ახსნას H-Ras-ის სხვადასხვა მგრძობელობა SNP-ის მიმართ.

მიტოქონდრია გადამწყვეტ როლს თამაშობს ჰიპოქსიის დროს ჟანგბადის რაოდენობის აღქმაში და პასუხობს ციტოზოლში ROS-ის გამოთავისუფლებით (Guzy RD, et al., 2006). უჯრედების დამუშავება NGF-ით იწვევს მიტოქონდრიის დაკავშირებას პლაზმურ მემბრანასთან და მიკრომილაკოვან ციტოქონჩხთან (Cassano S, et al., 2010). ამ კომპლექსში Ras იწყებს H₂O₂-ის წარმოქმნას სუპეროქსიდ დისმუტაზას გააქტიურების შედეგად, ERK1/2 გრძელვადიანი აქტივაციის შენარჩუნებას და PC-12 უჯრედების დიფერენცირებას. მეორეს მხრივ, პეროქსიდის

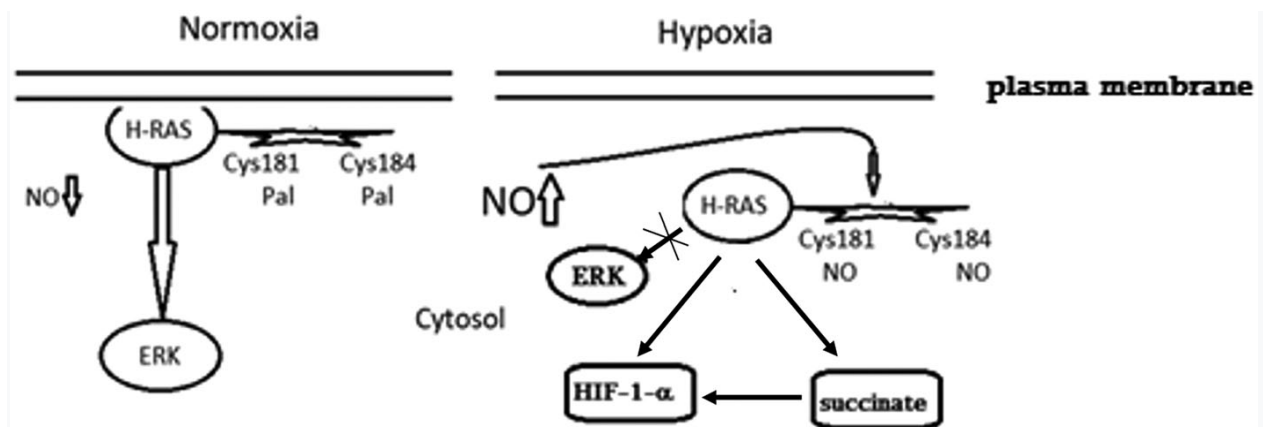
წარმოქმნის გარდა, Ras-ს შეუძლია პირდაპირ შეცვალოს მიტოქონდრიული მეტაბოლიზმი MAM ცილების მოდიფიკაციის გზით (Kang J, et al., 2013). MAM შეიცავს Bcl-2 ოჯახის ცილებს, რომლებიც დინამიურად ურთიერთქმედებენ IP3R-თან, რათა კოორდინაცია გაუწიონ მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ის ნაკადს და შეცვალონ უჯრედული მეტაბოლიზმი უჯრედების ბიოენერგეტიკული შესაძლებლობების გაზრდის მიზნით, განსაკუთრებით სტრესის დროს (Williams A, et al., 2016). დადასტურებულია, რომ Ras-ს აქვს პირდაპირი დაკავშირების უნარი Bcl-2 (Denis GV, et al., 2003) ან Bcl-xL-თან (Bivona TG, et al., 2006). სამივე Ras ცილა, K-, N- და H-Ras, ურთიერთქმედებს Bcl-2-თან; თუმცა, მათი მიტოქონდრიული მდებარეობა განსხვავებულად რეგულირდება სხვადასხვა გარემო ფაქტორების ზეგავლენით (Rebollo A, et al., 1999-a). აღსანიშნავია, რომ H-Ras^{V12} მნიშვნელოვნად ზრდის მიტოქონდრიულ მეტაბოლიზმს H-Ras-თან შედარებით (Sims NR, et al., 2008). ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები თანხვედრაშია ამ დაკვირვებებთან, რომლებშიც ნანახია, რომ H-Ras, ისევე როგორც H-Ras^{V12}, აძლიერებენ მიტოქონდრიული ATP-ის გამომუშავებას. თუმცა, ნიტროზილირებული H-Ras-ის ორივე ფორმისთვის შეუძლებელია ატფ-ის სინთეზის სტიმულირება, რაც გვაფიქრებინებს, რომ S-ნიტროზილირება ცვლის H-Ras-ის ურთიერთქმედებას მიტოქონდრიულ სამიზნეებთან. მეორეს მხრივ, მუტაციური H-Ras^{V12} მნიშვნელოვნად ამცირებს ROS-ის წარმოქმნას და ნიტროზილირების პროცესს. ჩვენს შემთხვევაში ეს არ გამორიცხავს H-Ras-ის ინჰიბიტორულ ეფექტს. დასკვნის სახით შეგვიძლია ვთქვათ, რომ ჩვენი შედეგების მიხედვით ჰიპოქსია ამცირებს ციტოპლაზმური H-Ras-ის ნიტროზილირებას, რომელმაც, თავის მხრივ, შეიძლება გამოიწვიოს ჟანგვითი მეტაბოლიზმის და მიტოქონდრიული ატფ-სინთეზის გააქტიურება.

ექსპერიმენტების პირველი ეტაპის შედეგად დავადგინეთ H-Ras-ის უჯრედშიდა გადანაწილების მნიშვნელობა ჰიპოქსიის პასუხის განვითარებაში. Ras ცილის შიდაუჯრედულ გადანაწილებაზე მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს მისი პოსტტრანსლაციური მოდიფიკაცია.

Ras GTPase-ები ჩართულია მრავალ ფუნდამენტურ სასიგნალო გზებში, რომლებიც გავლენას ახდენენ უჯრედულ ციკლზე, ზრდასა და აპოპტოზზე (Malumbres M, et al., 2003). ამ ცილების რეგულაციის დარღვევამ შეიძლება გამოიწვიოს მრავალი დაავადება, როგორცაა სიმსივნე, გულ-სისხლძარღვთა დაავადებები და ნევროლოგიური დარღვევები. დამტკიცებულია, რომ ჟანგბადის რეაქტიული სახეობები არეგულირებენ Ras ზეოჯახის GTPases აქტივობას, ცისტეინის თიოლის ჯგუფის მოდიფიკაციის მეშვეობით (Raines KW, et al., 2007; Mallis RJ, et al., 2001; Lander HM, et al., 1995; Burgoyne JR, et al., 2012). Cys-118 ნაშთის მოდიფიკაციამ შეიძლება პირდაპირი გავლენა მოახდინოს H-Ras-ის GTP/GDP თანაფარდობაზე, რომელიც შესაძლოა პასუხისმგებელი იყოს H-Ras-ის აქტივაციაზე (Lander HM, et al., 1995; Heo J. et al., 2011). მეორეს მხრივ, ზოგიერთ პირობებში, აზოტის ოქსიდი იწვევს H-Ras-ის გაშუალებული ERK აქტივაციის დათრგუნვას, რაც იმაზე მეტყველებს, რომ H-Ras-ის სხვა ცისტეინის ნაშთები (როგორცაა ტერმინალური Cys181 და Cys184) ასევე შეიძლება მოდიფიცირდეს (Baker T, et al., 2000). იმის გათვალისწინებით, რომ ცისტეინის ნაშთების S-ნიტროზილირების ინტენსივობა H-Ras-ში დამოკიდებულია NO-ის კონცენტრაციაზე უჯრედში, მიჩნეულია, რომ NO-ს დაბალი კონცენტრაციის (<0.1 mM) პირობებში ხდება Cys118-ის ნიტროზილირება, ხოლო მაღალ კონცენტრაციას (>0.1 mM) შეუძლია მოახდინოს ტერმინალური ცისტეინის მოდიფიცირება (Mallis RJ, et al., 2001; Batista WL, et al., 2013; Baker T, et al., 2000). ამრიგად, გარკვეულ პირობებში, როდესაც აზოტის ოქსიდის კონცენტრაცია იზრდება, პალმიტირების დინამიურობის დათრგუნვის შემდეგ შესაძლოა მოხდეს H-Ras-ის ინაქტივაცია და მემბრანასთან დაკავშირების შემცირება (Geyer M, et al., 1997; Quilliam LA, et al., 1995; Moon SY, et al., 2003). ამიტომ, რაინმა და სხვებმა (Raines et al) ივარაუდეს, რომ, რომ H-Ras შეიძლება გააქტიურდეს ან ინაქტივირდეს აზოტის ოქსიდის მიერ და ზემოაღნიშნული დამოკიდებულია უჯრედულ მდგომარეობაზე (Raines KW, et al., 2007). მაღალი უჯრედული აღდგენილი გარემოს პირობებში, სავარაუდოდ რედოქს-აგენტები ააქტიურებენ რედოქს-აქტიურ GTPase-ებს, ხოლო

ძლიერ დამჟანგველ გარემოში რედოქს-აგენტები იწვევენ ინჰიბირებას. ჰიპოქსია, თავად იწვევს ROS-ის წარმოქმნას. ამდენად, ტერმინალური ცისტეინების ჟანგვითი მოდიფიკაცია საკმაოდ ხშირია. მთავარი მექანიზმი, რომლითაც NO არეგულირებს როგორც ჰიპოქსიის სასიგნალო გზას, ასევე სხვა მრავალ უჯრედულ სამიზნეს, არის ცილების S-ნიტროზილირება (Foster MW, et al., 2003). ROS/NOS-ის წარმოქმნა იზრდება ჰიპოქსიისას და ამრიგად, ჰიპოქსიურმა მდგომარეობამ შეიძლება გამოიწვიოს ტერმინალური ცისტეინების დაჟანგვა, რასაც მოჰყვება დეპალმიტირება და H-Ras აქტივობის დათრგუნვა. ნებისმიერი ტერმინალური უბნის ცისტეინის ნაშთის დეპალმიტირება იწვევს H-Ras-ის დისფუნქციას და მდებარეობის შეცვლას, რამაც თავის მხრივ, შეიძლება გამოიწვიოს დარღვეული მეტაბოლური სასიგნალო გზის ჩართვა (Misaki R, et al., 2010).

ჩვენს მიერ მიღებულმა შედეგებმა დაადასტურა ეს ვარაუდი, ვინაიდან დავადგინეთ, რომ ჰიპოქსიურ პირობებში აზოტის ოქსიდის დონორი-SNP-ის თანაობისას მნიშვნელოვნად იზრდება H-Ras ცილის ნიტროზილირება. ნიტროზილირების გაზრდას თან ახლავს პალმიტირების შემცირება და ასევე ERK ფოსფორილირების დაქვეითება. Ras-ის სასიგნალო გზის ზემოაღნიშნული ცვლილებები იწვევს უჯრედშიდა სუქცინატის რაოდენობის მატებას, სავარაუდოდ ჟანგვითი მეტაბოლიზმის ცვლილების გამო (Barbakadze T, et al., 2017), რაც კორელაციაშია HIF-1-alpha აქტივობის მატებასთან. ამრიგად, შეიძლება დავასკვნათ, რომ ჰიპოქსიის დროს წარმოქმნილმა აზოტის ოქსიდის მაღალმა კონცენტრაციამ, შესაძლოა გამოიწვიოს H-Ras-ის ტერმინალური ცისტეინების ნიტროზილირება, რაც თავის მხრივ იწვევს H-Ras-ის უჯრედში მდებარეობის ცვლილებას და მისი აქტივობის დარღვევას. (სურათი 14) ეს ცვლილებები დაფიქსირდა როგორც D ასევე ND PC-12 უჯრედებში, თუმცა უპირატესად D PC-12 უჯრედებში.



სურათი 14. H-Ras-ის რეგულირების სქემატური გამოსახულება ნორმოქსია/ჰიპოქსიის დროს. ნორმოქსიის პირობებში და ჟანგბადის რეაქტიული სახეობების დაბალ კონცენტრაციებში, H-Ras-ის ტერმინალური ცისტეინების ნაშთები პალმიტოილირებულია და ცილა შეკავშირებულია პლაზმურ მემბრანასთან და გავლენას ახდენს ყველაზე მნიშვნელოვან Ras-ERK სასიგნალო გზაზე. ჰიპოქსიურ პირობებში და მაღალი ROS/NOS ზემოქმედებისას ტერმინალური ცისტეინებზე, ნიტროზილაცს შეუძლია გამოიწვიოს პალმიტოილირების ციკლის დარღვევა და H-Ras-ის ლოკალიზაციის ცვლილება. ამ შემთხვევაში, H-Ras -ს შეუძლია იმოქმედოს ალტერნატიული გზით, რომელიც რთავს და ააქტიურებს PI3-კინაზას/HIF-1-ალფას. (Goloshvili, G., et al., 2019).

დასკვნები

1. ჰიპოქსიის პირობებში მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras-ის ენდოგენური ნიტროზილირება არ იცვლება, არც დიფერენცირებულ და არც არადიფერენცირებულ უჯრედებში. თუმცა, SNP-ის დამატება მნიშვნელოვნად ზრდის ნიტროზილირებული H-Ras-ის რაოდენობას არადიფერენცირებულ და დიფერენცირებულ უჯრედებში ჰიპოქსიის დროს. აზოტის ოქსიდის მაღალმა კონცენტრაციამ შეიძლება შეცვალოს მემბრანადაკავშირებული H-Ras-ის ნიტროზილირების ხარისხი, რადგან PC-12 უჯრედებში NOS-ის სხვადასხვა უჯრედში და ლოკალიზაცია და აქტივობა იწვევს H-Ras-ის სხვადასხვა მგრძობელობას SNP-ის მიმართ.
2. ჰიპოქსიურ პირობებში ციტოზოლური ნიტროზილირებული H-Ras-ის რაოდენობა მცირდება, როგორც SNP-ის არსებობისას, ასევე არარსებობის პირობებში დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში. არადიფერენცირებულ უჯრედებში ჰიპოქსია არ ცვლის ციტოზოლური ნიტროზილირებული H-Ras-ის რაოდენობას. ჰიპოქსიის დროს წარმოქმნილმა აზოტის ოქსიდის მაღალმა კონცენტრაციამ, შესაძლოა გამოიწვიოს H-Ras-ის ტერმინალური ცისტეინების ნიტროზილირება, რაც თავის მხრივ იწვევს H-Ras-ის უჯრედში მდებარეობის ცვლილებას და მისი აქტივობის დარღვევას არადიფერენცირებულ პროლიფერირებად PC12 უჯრედებში.
3. ნორმალური H-Ras, ისევე როგორც მუტანტური H-Ras^{V12}, აძლიერებენ მიტოქონდრიული ATP-ის გამომუშავებას. თუმცა, S-ნიტროზილირება ამცირებს ორივე H-Ras-ის სტიმულატორულ ეფექტს მიტოქონდრიაზე H-Ras-ის მიტოქონდრიული სამიზნეების ცვლილების შედეგად. არც ნიტროზილირებული და არც არამოდულირებული ნორმალური H-Ras არ ცვლის ROS-ის წარმოქმნას, თუმცა მუტანტური H-Ras^{V12} მნიშვნელოვნად ამცირებს მიტოქონდრიული ROS-ის რაოდენობას და ეს ეფექტი არ იხსნება

მუტანტური H-Ras^{V12}-ის ნიტროზილირების შედეგად. ჰიპოქსიას შეუძლია შეამციროს ციტოპლაზმური H-Ras-ის S-ნიტროზილირება დიფერენცირებულ PC-12 უჯრედებში და მოხსნას ნიტროზილირებული H-Ras-ის ინჰიბიტორული ეფექტი მიტოქონდრიაში არსებულ ჟანგვით ფოსფორილირებაზე.

4. ჰიპოქსიურ პირობებში აზოტის ოქსიდის დონორი-SNP-ის თანაობისას მნიშვნელოვნად იზრდება მემბრანა-დაკავშირებული H-Ras ცილის ნიტროზილირება არადიფერენცირებულ პროლიფერირებად PC-12 უჯრედებში. ნიტროზილირების გაზრდას თან ახლავს პალმიტირების შემცირება და ასევე ERK ფოსფორილირების დაქვეითება. Ras-ის სასიგნალო გზის ზემოაღნიშნული ცვლილებები იწვევს უჯრედშიდა სუქცინატის რაოდენობის მატებას, სავარაუდოდ ჟანგვითი მეტაბოლიზმის ცვლილების გამო, რაც კორელაციაშია HIF-1-alpha-ს აქტივობის მატებასთან.
5. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ამ კვლევებმა შესაძლოა მნიშვნელოვანი როლი შეასრულოს ონკოლოგიური დაავადებების მიზანმიმართულ ქიმიოთერაპიაში, რადგან მრავალი ტიპის სიმსივნის ეტიოპათოგენეზში რედოქს-აგენტების მიერ Ras-ის აქტივობის დარღვევას წამყვანი მნიშვნელობა ენიჭება.

გამოყენებული ლიტერატურის ჩამონათვალი

1. Ahearn IM, Tsai FD, Court H, et al. FKBP12 binds to acylated H-ras and promotes depalmitoylation. *Mol Cell*. 2011; 41(2):173-185.
2. Aktories K., Rosener S., Blaschke U. and Chatwal G.S. BotulinumADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *European Journal of Biochemistry* 1988,172:445–450
3. Albert S and Gallwitz D. Two new members of a family of Ypt/RabGTPase activating proteins. Promiscuity of substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 33186–33189.
4. Altschuler D and Lapetina EG. Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268: 7527–7531.
5. Altschuler DL and Ribeiro-Neto F. Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b. *Proceeding of National Academy of Sciences USA* 1998; 95: 7475–7479
6. Arundine M, Sanelli T, Ping He B, Strong MJ. NMDA induces NOS 1 translocation to the cell membrane in NGF-differentiated PC 12 cells. *Brain Res*. 2003; 976(2): 149- 158.
7. Baker T.A., Booden M.A., Buss J.E. S-Nitrosocysteine Increases Palmitate Turnover on Ha-Ras in NIH 3T3 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275,22037-22047.
8. Baker TL, Zheng H, Walker J, Coloff JL, Buss J. Distinct rates of palmitate turnover on membrane-bound cellular and oncogenic H-ras. *J Biol Chem*. 2003; 278(21):19292-19300.
9. Banerjee S, Liao L, Russo R, Nakamura T, McKercher SR, Okamoto S, Haun F, Nikzad R, Zaidi R, Holland E, Eroshkin A, Yates JR 3rd, Lipton SA. Isobaric tagging-based quantification by mass spectrometry of differentially regulated proteins in synaptosomes of HIV/gp120 transgenic mice: implications for HIV-associated neurodegeneration. *Exp Neurol*. 2012; 236:298–306.
10. Barbacid M., *ras genes*. *Annual Reviews Biochem*. 1987, 5: 779-827.

11. Barbakadze T, Goloshvili G, Narmania N, Zhuravliova E, Mikeladze D. Subcellular distribution of S-nitrosylated H-Ras in differentiated and undifferentiated PC12 cells during hypoxia. *Cell J.* 2017; 19(3):443-451.
12. Batista WL, Ogata FT, Curcio MF, et al. Monteiro S-Nitrosoglutathione and endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulate compartmentalized Ras S-nitrosylation and stimulate cell proliferation. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(3):221-238.
13. Bátor J, Varga J, Berta G, et al. Sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, fails to bypass the block of neuronal differentiation in PC12 cells imposed by a dominant negative Ras protein. *Cell Mol Biol Lett.* 2012; 17(3):323-332.
14. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2:325–334.
15. Bell EL, Chandel NS. Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. *Essays Biochem.* 2007; 43:17-27.
16. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000; 3:1301–1306.
17. Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, et al. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell.* 2006; 21(4): 481-493.
18. Bononi A, Agnoletto C, De ME *et al.* Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res* 2011;2011:329098
19. Bos JL, ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res* 49(1989),(17):4682–4689
20. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991; 351:714–718.

21. Brigidi GS, Bamji SX. Detection of protein palmitoylation in cultured hippocampal neurons by immunoprecipitation and acyl-biotin exchange (ABE). *J Vis Exp*. 2013; 72:e50031.
22. Brown GC, Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide peroxynitrite and S-nitrosothiols, *Biochim. Biophys. Acta*. 2004; 1658:44–49.
23. Brown R., Marshall C.J., Pennie S.G. and Hall A. Mechanism of activation of an N-*Ras* gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. *EMBO Journal* 1984; 3: 1321–1326.
24. Burgoyne JR, Haeussler DJ, Kumar V, et al. Oxidation of HRas cysteine thiols by metabolic stress prevents palmitoylation in vivo and contributes to endothelial cell apoptosis. *FASEB J*. 2012; 26(2):832-841.
25. Burns M.E., Sasaki T, Takai Y. and Augustine G.J. Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *Journal of Gen Physiol* 1998; 111: 243–255.
26. Burwell LS, Nadtochiy SM, Tompkins AJ, Young S, Brookes PS. Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem J*. 2006; 394:627–634.
27. Buyru N, Tigli H, Ozcan F, Dalay N. Ras oncogene mutations in urine sediments of patients with bladder cancer. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(4):399-402
28. C.S. KIM, I.A. ROSS. Regulatory Role of Free Fatty Acids (FFAs)—Palmitoylation and Myristoylation. *Food Nutr. Sci.*, 4: 202 (2013).
29. Cassano S, Agnese S, D'Amato V, Papale M, Garbi C, Castagnola P, et al. Reactive oxygen species, Ki-Ras, and mitochondrial superoxide dismutase cooperate in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *J Biol Chem*. 2010; 285(31): 24141-24153.
30. Chamberlain LH, Shipston MJ. The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev*. 2015; 95(2):341-376.
31. Chen Z., Otto J. C., Bergo M. O., Young S. G., Casey P. J. The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *J. Biol. Chem*. 2000, 275, 41251-41257

32. Chiaradonna F, Gaglio D, Vanoni M, Alberghina L. Expression of transforming K-Ras oncogene affects mitochondrial function and morphology in mouse fibroblasts. *BiochimBiophysActa 2006-a; 1757:1338-1356.*
33. Chiaradonna F, Sacco E, Manzoni R, *et al.* Ras-dependent carbon metabolism and transformation in mouse fibroblasts. *Oncogene 2006-b; 25:5391-5404.*
34. Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA. S-Nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science. 2009; 324:102– 105.*
35. Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA, Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci.* 2000 Jan; 3(1):15-21.
36. Choy E, *et al.* Endomembrane trafficking of ras: The CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell (1999) 98(1):69–80.*
37. Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science.* 2004; 304:1328–1331.
38. Clara Aicart-Ramos, Ruth Ana Valero, Ignacio Rodriguez-Crespo. "Protein palmitoylation and subcellular trafficking". *Biochimica et Biophysica Acta 1808 (2011) 2981–2994*
39. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994; 345:50–54.
40. Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:7631–7636.

41. Dahm CC, Moore K, Murphy MP. Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite: implications for the interaction of nitric oxide with mitochondria. *J Biol Chem.* 2006; 281:10056–10065.
42. Dekker FJ, Rocks O, Vartak N, et al. Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat Chem Biol.* 2010; 6(6):449-456.
43. Denis GV, Yu Q, Ma P, Deeds L, Faller DV, Chen CY. Bcl-2, via its BH4 domain, blocks apoptotic signaling mediated by mitochondrial Ras. *J Biol Chem.* 2003; 278(8): 5775-5785.
44. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79(11):3637-40.
45. Drapier JC, Hibbs JB Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in l-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol.* 1988; 140:2829–2838.
46. Ekshyyan O, Aw TY. Decreased susceptibility of differentiated PC12 cells to oxidative challenge: relationship to cellular redox and expression of apoptotic protease activator factor-1. *Cell Death Differ.* 2005; 12(8):1066-1077.
47. Esteban L. M., Vicario-Abejon C., Fernandez-Salguero P., Fernandez-Medarbe A., Swaminathan N., Yenger K., Lopez E., Malumbres M., McKay R., Ward J M., Pellicer A., Santos E., Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21, 1444-1452
48. Fehrenbacher N, Bar-Sagi D, Philips M. Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol.* 2009; 3(4): 297- 307.
49. Fernández-Medarde A, De Las Rivas J, Santos E. 40 Years of RAS-A Historic Overview. *Genes (Basel).* 2021 May 1;12(5):681. doi: 10.3390/genes12050681. PMID: 34062774; PMCID: PMC8147265.

50. Fernández-Medarde Alberto, Santos Eugenio. "Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer*. 2011, 2(3) 344–358).
51. Finkel T, Review Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011 Jul 11; 194(1):7-15.
52. Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A. Ubiquitin as a central cellular regulator. *Cell* 2004;116:2.
53. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*. 2003; 9(4):160-168.
54. Frame S. and Balmain A. Integration of positive and negative growth signals during Ras pathway activation in vivo. *Current Opinion in Genetics & Development* 2001; 10: 106-113
55. Garcia, A. M., Rowell, C., Ackermann, K., Kowalczyk, J.J., and Lewis, M. D Peptodomimetic inhibitors of Ras farnesylation and function in whole cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268: 18415-18418.
56. Geyer M, Wittinghofer A. GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at t regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 1997; 7(6):786-792.
57. Goloshvili, G., Barbakadze, T., & Mikeladze, D. (2019). Sodium nitroprusside induces H-ras depalmitoylation and alters the cellular response to hypoxia in differentiated and undifferentiated PC12 cells. *Cell Biochemistry and Function*, 37(7), 545-552. doi:10.1002/cbf.3431
58. Goodwin JS, et al. DepalmitoylatedRas traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicularpathway. *J Cell Biol*. 2005; 170:261–72
59. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013; 12(12): 931-947.

60. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*. 2002; 297:1186–1190.
61. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*. 2006; 91(5): 807-819.
62. Hamilton M., Liao J., Cathcart M. K., Wolfman A., Constitutive association of c-N-Ras with Raf-1 and PKC in latent signalling modules. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276: 29079-29090.
63. Hamilton M., Wolfman A., Ha-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* 1998, 16: 1417-1428.
64. Hawkins R., Cerebral energy metabolism, in: D.W. McCandless (Ed.), Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy, Plenum Press, New York, 1985, pp. 3–17
65. Heo J. Redox control of GTPases: from molecular mechanisms to functional significance in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15(4):689-724.
66. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6:150–166.
67. Hess, D.T., Patterson, S. I., Smith, D. S., and Skene, J. H.P. Neuronal growth cone collapse and inhibition if protein fatty acylation by nitric oxide. *Nature* 1993, 366: 562-565.
68. Ho GP, Selvakumar B, Mukai J, Hester LD, Wang Y, Gogos JA, Snyder SH. S-Nitrosylation and Spalmitoylation reciprocally regulate synaptic targeting of PSD-95. *Neuron*. 2011; 71:131–141.
69. Ho JJ, Man HS, Marsden PA. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med (Berl)*. 2012; 90(3): 217-231.
70. Hota SK, Barhwal K, Singh SB, Sairam M, Ilavazhagan G. NR1 and GluR2 expression mediates excitotoxicity in chronic hypobaric hypoxia. *J Neurosci Res*. 2008 Apr; 86(5):1142-52

71. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*. 1994; 265:1883–1885.
72. James G. L., Goldstein J. L., Brown M. S., Polylysine and CVIM sequences of K-RasB dictate specificity of prenylation and confer resistance to benzodiazepine peptidomimetic in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 6221-6226.
73. Juan P Bolaños, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia, Volume 1411, Issues 2–3, 5 May 1999
74. Kaira K, Endo M, Abe M, *et al.* Biologic correlates of (1) F-FDG uptake on PET in pulmonary pleomorphic carcinoma. *Lung Cancer* 2011; 71:144-150.
75. Kalisch BE, Demeris CS, Ishak M, Rylett RJ. Modulation of nerve growth factor-induced activation of MAP kinase in PC12 cells by inhibitors of nitric oxide synthase. *J Neurochem*. 2003; 87(6):1321-1332.
76. Kang J, Pervaiz S. Crosstalk between Bcl-2 family and Ras family small GTPases: potential cell fate regulation? *Front Oncol*. 2013; 2: 206.
77. Kang R, Wan J, Arstikaitis P, *et al.* *Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation*. 456; 2008:904-909.
78. Kharbanda S., Saxena S., Yoshida K., Pandey P., Kaneki M., Wang Q., Cheng K., Chen Y. N., Campbell A., Sudha T., Yuan Z. M., Narula J., Weichselbaum R., Nalin C., Kufe D., Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. *The Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 322-327.
79. Kim A, Davis R, Higuchi M. Intracellular oxygen determined by respiration regulates localization of Ras and prenylated proteins. *Cell Death Dis*. 2015; 6: e1825.
80. Kim JW, Dang CV. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* 2006; 66:8927-8930.)
81. Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science*. 2005; 310:1966–1970.

82. Kwak YD, Ma T, Diao S, Zhang X, Chen Y, Hsu J, Lipton SA, Masliah E, Xu H, Liao FF. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN inhibition in neurodegeneration. *MolNeurodegener.* 2010; 5:49.
83. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature.* 1993; 364:535–537.
84. Lander H. M., Ogiste, J. S., Pearce, S. F., Levi, R. &Novogrodsky, A. p21Ras a Common Signaling Target of Reactive Free Radicals and Cellular Redox Stress *The Journal of Biological Chemistry*1995, 270: 7017-7020.
85. Lander, H. M., Hajjar, D. P., Hempstead, B. L., Mirza, U. A., Chait, B. T., Campbell, S. &Quilliam, L. A., A Molecular Redox Switch on p21^{ras}. Structural basis for the nitric oxide-p21^{ras} interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 1998, 272: 4323–4326.
86. Leever SJ, Paterson HF, Marshall CJ. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature.* 1994; 369:411–414;
87. Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron.* 1992; 8:1087–1099.
88. Leon J., Cuerrero I. and Pellicer A. Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7: 1535-1540.
89. Li L, Liu F, Salmonsens RA, Turner TK, Litofsky NS, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Jones SN, Recht LD, Ross AH. PTEN in neural precursor cells: regulation of migration, apoptosis, and proliferation. *Mol Cell Neurosci.* 2002; 20:21–29.
90. Li L., Feng Z. and Porter A.G. JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on serine 63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 4058.
91. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates

- dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* 1999; 5:1403–1409.
92. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitrosocompounds. *Nature.* 1993; 364:626–632.
93. Lipton SA, Choi YB, Takahashi T, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA. Cysteine regulation of protein function as exemplified by NMDA-receptor modulation. *Trends Neurosci.* 2002; 25:474–480.
94. Lowy D.R. and Willumsem B. M. Function and regulation of ras. *Annu.Rev. Biochem.* 1993, 62: 851-891.
95. Lust W.D, Yasumoto Y, Wittingham T.S, Djuricic B, Mrsulja B.B, Passonneau J, Ischemic encephalopathy, in: D.W. McCandless (Ed.), Cerebral Energy Metabolism and Metabolic Encephalopathy, Plenum Press, New York, 1985, pp. 79–112.
96. M.E. Linder, R.J. Deschenes, New insights into the mechanisms of proteinpalmitoylation, *Biochemistry* 42 (2003) 4311–4320)
97. M.P. da Silva., Cedraz-Merchez, P.L., Varanda, W.A., 2014. Effects of nitric oxide on magnocellular neurons of the supraoptic nucleus involve multiple mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 47, 90e100
98. Magee A.I., Newman C.M., Giannakouros T., Hancock J.F., Fawell E. and Aarmstrong J. Lipid modifications and function of the Ras superfamily of proteins. *Biochemical Soc. Trans.* 1992; 20: 497–499.
99. Mallis RJ, Buss JE, Thomas JA. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem J* 2001. 355(1):145-153.
100. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6):459-465.
101. Malumbres, M. & Pellicer, A. Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front. Biosci.* 3, D887–D912 (1998).

102. Manukhina, E.; Downey, H.F.; Mallet, R.T. Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Exp. Biol.Med.* 2006, 231, 343–365
103. Martínez-Ruiz A, Araújo IM, Izquierdo-Álvarez A, Her- nansanz-Agustín P, Lamas S, Serrador JM. Specificity in S-Nitrosylation: a short-Range mechanism for NO signal- ing antioxid redox signal. 2013; 19(11): 1220-1235.
104. Martinez-Ruiz A, Lamas S. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S- glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc Res.* 2007; 75:220–228.
105. Mattson MP, Chan SL, DuanW,ReviewModification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior.*Physiol Rev.* 2002 Jul; 82(3):637-72.
106. Meng F., Liu L., Chin P. and D’Mello S.R. Aktis a downstream target of NF-κB. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 29674-29680.
107. Michiels C: Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 2004, 164:1875-1882
108. Misaki R, Morimatsu M, Uemura T, et al. (2010) Palmitoylated Ras proteins traffic through recycling endosomes to the plasma membrane during exocytosis. *J. Cell Biol.* 2010; 191(1):23-29.
109. Moon SY, Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation.
110. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13:448–462.
111. Morgan, M., Ganser, A. & Reuter, C. Therapeutic efficacy of prenylation inhibitors in the treatment of myeloid leukemia. *Leukemia* 17, 1482–1498 (2003). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403024>
112. Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:174–9.
113. Nakamura T, Lipton SA. S-Nitrosylation and uncompetitive/fast off-rate (UFO) drug therapy in neurodegenerative disorders of protein misfolding. *Cell Death Differ.* 2007; 14:1305–1314.

114. Nakamura T, Tu S, Akhtar MW, et al. Aberrant protein s-nitrosylation in neurodegenerative diseases. *Neuron*. 2013 May;78(4):596-614. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.05.005. PMID: 23719160; PMCID: PMC3712898.)
115. Nakato R, Ohkubo Y, Konishi A, et al. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2015;5(1):14812.
116. Nathan C, Calingasan N, Nezezon J, Ding A, Lucia MS, La Perle K, Fuortes M, Lin M, Ehrt S, Kwon NS, Chen J, Vodovotz Y, Kipiani K, Beal MF. Protection from Alzheimer's-like disease in the mouse by genetic ablation of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 2005; 202:1163–1169.
117. Numajiri N, Takasawa K, Nishiya T, Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W, Asada M, Matsuda H, Azumi K, Kamata H, Nakamura T, Hara H, Minami M, Lipton SA, Uehara T. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108:10349–10354
118. Oeste CL, Díez-Dacal B, Bray F, et al. The C-terminus of H-Ras as a target for the covalent binding of reactive compounds modulating Ras-dependent pathways. *PLoS ONE*. 2011; 6(1):e15866.
119. Okouchi M, Okayama N, Aw TY. Differential susceptibility of naive and differentiated PC-12 cells to methylglyoxal-induced apoptosis: influence of cellular redox. *Curr Neurovasc Res*. 2005; 2(1):13-22.
120. Oliver Rocks, Marc Gerauer, Nachiket Vartak, Sebastian Koch, Zhi-Ping Huang, Markos Pechlivanis, Jjrgen Kuhlmann, Lucas Brunsveld, Anchal Chandra, Bernhard Ellinger, Herbert Waldmann, Philippe I.H. Bastiaens, The Palmitoylation Machinery Is a Spatially Organizing System for Peripheral Membrane Proteins, *Cell* 141, 2010, 458-471, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.007>
121. Overmeyer. J. H. et. al. The putative Switch 2' domain of the Ras related GTP-ase. Rab1B plays an essential role in the interaction with Rab escort protein. *Mol. Biol. Cell*. 1998, 9: 223-225.

122. Pei, E. F., Krengel, U., Petsko, G. A., Goody, R. S., Kabsch, W. and Wittinghofer, A. Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* 1990, 9: 2351-2359.
123. Peruzzi F., Prisco M., Morrione A., Valentini B., Baserga R., Anti-apoptotic signaling of the IGF-1 receptor through mitochondrial translocation of c-Raf and Nedd4. *Journal of Biological Chemistry.* 2001, 276: 25990-25996.
124. Philips, M. Targeting Ras Membrane Association: Still an Achilles Heel. 2015.
125. Prabakaran Sudhakaran, Lippens Guy, Steen Hanno and Gunawardena Jeremy. Posttranslational modification: nature's escape from genetic imprisonment and the basis for dynamic information encoding. *WIREs Syst Biol Med* 2012. doi: 10.1002/wsbm.1185
126. Prior IA, Hancock JF. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012-a; 23 (2): 145-153.
127. Prior IA, Lewis PD, Mattos C A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* (2012-b) 72(10):2457-2467.
128. Quilliam LA, Khosravi-Far R, Huff SY, Der CJ. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioassays.* 1995; 17(5):395-404.
129. Raines KW, Bonini MG, Campbell SL. Nitric oxide cell signaling: S-nitrosation of Ras superfamily GTPases. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(2):229-239.
130. Rajalingam K, Schreck R, Rapp UR, Albert S. Ras oncogenes and their downstream targets. *BiochimBiophysActa.* 2007;1773(8):1177-95;
131. Rebollo A, Pérez-Sala D, Martínez-A C. Bcl-2 differentially targets K-, N-, and H-Ras to mitochondria in IL-2 supplemented or deprived cells: Implications in prevention of apoptosis. *Oncogene.* 1999-a; 18(35): 4930-4939
132. Rebollo A. and A-C Martines. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood* 1999-b; 94: 2971-2980.
133. Resh MD. Targeting protein lipidation in disease. *Trends MolMed* 2012; 18:206-214.

134. Revich M, Brann Jr A.W, Shapiro H.M, Myers R.E, Regional cerebral blood flow during prolonged partial asphyxia, in: Meyer J.S, Revich M, Lechner H, Eichorn O. (Eds.), *Research on the Cerebral Circulation. Fifth International Salzburg Conference*, Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1972, pp. 216–22
135. Rhett JM, Khan I, O'Bryan JP. Biology, pathology, and therapeutic targeting of RAS. *Adv Cancer Res.* 2020; 148:69-146. doi: 10.1016/bs.acr.2020.05.002. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32723567; PMCID: PMC7393484.
136. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, et al. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *AnalBiochem.* 2010; 401(2):318-320.
137. S. Lobo, W.K. Greentree, M.E. Linder, R.J. Deschenes, Identification of a Raspalmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* 277(2002)41268–41273;
138. Santillo M., Mondola P., Seru R., Annella T., Cassano S., Ciullo I., Tecce M. F., Iacomino G., Damiano S., Cuda G., Paterno R., Martignetti V., Mele E., Feliciello A., Avvedimento E. V., Opposing functions of Ki- and Ha-Ras genes in the regulation of redox signals. *Curr. Biol.* 2001, 11: 614-619.
139. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, et al. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell.* 2005;7(1):77-85.
140. Seth D, Stamler JS. The SNO-proteome: causation and classifications. *CurrOpinChem Biol.* 2011; 15:129–136.
141. Shanshiashvili L, Narmania N, Barbakadze T, et al. S-Nitrosylation decreases the adsorption of H-Ras in lipid bilayer and changes intrinsic catalytic activity. *Cell Biochem Biophys.* 2011; 59(3):191-199.
142. Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Onco-gene.* 2001; 20(52):7624-7634.

143. Shi ZQ, Sunico CR, McKercher SR, Cui J, Feng GS, Nakamura T, Lipton SA, S-nitrosylated SHP-2 contributes to NMDA receptor-mediated excitotoxicity in acute ischemic stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 19; 110(8):3137-42.
144. Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C.J. Understanding ras: it ain't over 'till it's over'. *Trends Cell Biol*. 2000, 10: 147-154
145. Shih T.Y., Williams D.R., Weeks M.O., Maryak J.M., Vass W.C. and Scolnick E.M. Comparison of the genomic organization of Kirsten and Harvey sarcoma viruses. *Journal of Virology* 1978; 27: 45-55.
146. Sims NR, Anderson MF. Isolation of mitochondria from rat brain using Percoll density gradient centrifugation. *Nat Protoc*. 2008; 3(7): 1228-1239.
147. Stamler JS, Lamas S, Fang FC, Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*. 2001 Sep 21; 106(6):675-83.
148. Stamler JS, Toone EJ. The decomposition of thionitrites. *Curr Opin Chem Biol*. 2002; 6:779-785.
149. Sweatt J.D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry* 2001; 76: 1-10.
150. Takai Y., Kaibuchi K., Kikuchi A. and Kawata M. Small GTP-binding proteins. *Int. Review of Cytology* 1992; 133: 187-230.
151. Takai Y., Sasaki T. and Matozaki T. Small GTP-binding Proteins. *Physiological Reviews* 2001, 81 (1): 153-189.
152. Telang S, Lane AN, Nelson KK, Arumugam S, Chesney J. The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol Cancer*. 2007; 6: 77.
153. Teng K.K., Esposito D.K., Schwartz G.D. et al. Activation of c-Ha-Ras by Nitric Oxide Modulates Survival Responsiveness in Neuronal PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 37315-37320.

154. Thomas, J. A., Poland, B. and Honzatko, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995, 319, 1-9.
Trends Cell Biol. 2003; 13(1):13-22.
155. Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-Nitrosylated protein-disulphideisomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature.* 2006; 441:513–517. [PubMed: 16724068]
156. Umbrello M, Dyson A, Feelisch M, Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 19(14):1690-1710.
157. Vafa O, Wade M, Kern S, *et al.* c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* 2002; 9:1031-1044.
158. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029-1033
159. Varga J, Bátor J, Nádasdi G, Árvai Z, Schipp R, Szeberényi J. Partial protection of PC12 cells from cellular stress by low-dose sodium nitroprusside pre-treatment. *Cell Mol Neurobiol.* 2016; 36(7):1161-1168.
160. Voice J. K., Klemke R. L., Le A., Jackson J. H., Four human ras homologs differ in their ability to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *Journal of Biological Chemistry.* 1999, 274: 17164-17170.
161. Vojtek A.B., Hollenberg S.M. and Cooper J.A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 1993; 74: 205–214.
162. Wainwright MS, Brennan LA, Dizon ML, Black SM. p21ras activation following hypoxia-ischemia in the newborn rat brain is dependent on nitric oxide synthase activity but p21ras does not contribute to neurologic injury. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 146(1-2): 79-85.

163. Wang and Michaelis, Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci.* 2010 Mar 30;2:12
164. Wang C, Chen X, Shi W, et al. 2-Bromopalmitate impairs neural stem/progenitor cell proliferation, promotes cell apoptosis and induces malformation in zebrafish embryonic brain. *Neurotoxicol Teratol.* 2015; 50:53-63.
165. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956, 123:309-314)
166. Wilcock DM, Lewis MR, Van Nostrand WE, Davis J, Previti ML, Gharkholonarehe N, Vitek MP, Colton CA. Progression of amyloid pathology to Alzheimer's disease pathology in an amyloid precursor protein transgenic mouse model by removal of nitric oxide synthase 2. *J Neurosci.* 2008; 28:1537–1545.
167. Williams A, Hayashi T, Wolozny D, Yin B, Su TC, Betenbaugh MJ, et al. The non-apoptotic action of Bcl-xL: regulating Ca²⁺ signaling and bioenergetics at the ER-mitochondrion interface. *J Bioenerg Biomembr.* 2016; 48(3): 211-225.
168. Williams JG, Pappu K, Campbell SL. Structural and biochemical studies of p21Ras S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(11): 6376-6381.
169. Wolfman C., Palmby Todd, Channing J. Der, 2, 3 and Alan Wolfman. Cellular N-Ras Promotes Cell Survival by Downregulation of Jun N-Terminal Protein Kinase and p38 Janice. *Molecular and Cellular Biology.* 2002, 22(5): 1589-1606.
170. Wolfman J. C., Wolfman A., Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275: 19315-19323.
171. Wright LP, Philips MR Thematic review series: Lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* (2006) 47(5): 883–891.
172. Xu L, Han C, Lim K, Wu T. Activation of cytosolic phospholipase A2alpha through nitric oxide-induced S-nitrosylation. Involvement of inducible nitric-oxide synthase and cyclooxygenase-2. *J Biol Chem.* 2008; 283:3077–3087.

173. Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi ZQ, Ma Y, Gaston B, Palmer LA, Rockenstein EM, Zhang Z, Masliah E, Uehara T, Lipton SA. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:10810–10814.
174. Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki M. S-Nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem*. 2005; 280:7511–7518.
175. Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012; 337:1062–1065.
176. Yumin Hu, Weiqin Lu, Gang Chen, Peng Wang, Zhao Chen, Yan Zhou, Marcia Ogasawara, Duniyaporn Trachootham, Li Feng, Helene Pelicano, Paul J Chiao, Michael J Keating, Guillermo Garcia-Manero, Peng Huang „K-rasG12V transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis“. *Cell Research* (2012) 22:399-412
177. Yun H.Y., Gonzalez-Zulueta M., Dawson V. and Dawson T. Nitric oxide mediates N-methyl-D-aspartate receptor-induced activation of p21^{Ras} *Neurobiology* 1998; 95: 5773-5778.
178. Zhang J, Jin B, Li L, Block ER, Patel JM. Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 288:C840–849.
179. Zippel R., Balestrini M., Lomazzi M., Sturani E. Calcium and calmodulin are essential for Ras-GRF1-mediated of the Ras pathway by lypophosphatic acid. *Experimental Cell Research* 2000; 258: 403-408