

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна

На правах рукопису

ЯЗЛОВИЦЬКА Євгенія Михайлівна

**ПРОТЕЇНКІНАЗА-С-ЗАЛЕЖНИЙ МЕХАНІЗМ  
ІНГІБУВАННЯ КЛІТИННОЇ ПРОЛІФЕРАЦІЇ  
ПІД ВПЛИВОМ ФАРНЕСОЛУ**

03.00.04 – біохімія

**А в т о р е ф е р а т**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ 1997

577.1

ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00751842 (R)

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в лабораторії клітинної біології факультету мікробіології та молекулярної генетики Медичного центру Канзаського університету, США та у відділі біохімії м'язів Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України.

Наукові керівники: доктор біологічних наук, професор Михайло Дмитрович Курський

професор мікробіології  
Юрій Мельникович

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Зиновій Дмитрович Воробець

доктор біологічних наук, професор  
Микола Федорович Стародуб

Провідна організація - Національний університет імені Тараса Шевченка

Захист відбудеться "24" березня 1997 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 01.84.01 в Інституті біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України за адресою: 252601-МПС, Київ, вул. Миколи Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України.

Автореферат розіслано "20" лютого 1997 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

О.В. Кірсенко

AB - 37.017

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

### Актуальність теми.

Ізопреноїди - це ключові попередники синтезу холестерину de novo в клітинах тварин і людини. Метаболізм ізопреноїдів контролюється багатостадійним регуляторним механізмом (Edwards, 1991). Досконала регуляція рівня ізопреноїдів у клітинах необхідна тому, що ці сполуки відіграють важливу роль також у процесах клітинної проліферації. Так, якщо біосинтез таких ізопреноїдів, як фARNЕСОЛпірофосфат та жеранилжеранолпірофосфат, заблоковано, синтез клітинної ДНК і, відповідно, клітинна проліферація припиняються (Chen, 1979). Цей ефект пов'язаний з посттрансляційною модифікацією ряду клітинних протеїнів, яка полягає в ковалентному приєднанні залишків фARNЕСОЛУ та жеранилжеранолу до специфічної С-кінцевої послідовності поліпептиду. Більшість з таких протеїнів відноситься до G-білків - ключових молекул в процесах трансмембранної передачі клітинних сигналів; пренилювання цих білків є необхідною умовою їхньої участі в регуляції клітинної проліферації (Faust and Krieger, 1987).

ФARNЕСИЛПРОТЕІНТРАНСФЕРАЗА - фермент, що забезпечує фARNЕСИЛЮВАННЯ протеїнів, вимагає для каталітичної реакції лише фосфорильований ізопреноїд і не може використовувати нефосфорильовану форму - вільний фARNЕСОЛ (Lai et al., 1990). Але оскільки в тваринних клітинах вільний фARNЕСОЛ є продуктом метаболічного перетворення фARNЕСОЛПІРОФОСФАТУ (Das and Allen, 1991), то властивість фARNЕСОЛУ інгібувати ріст клітин (Melnykovych et al, 1992; Chakrabarti and Engleman, 1991) свідчить про його можливу участь в регуляції процесів клітинної проліферації. Однією з перших спроб з'ясувати механізм інгібувальної дії вільного фARNЕСОЛУ на ріст клітин було припущення, що він може діяти як конкурентний інгібітор фARNЕСИЛПРОТЕІНТРАНСФЕРАЗИ (Chakrabarti and Engleman, 1991). Подальші дослідження, однак, показали, що механізм дії фARNЕСОЛУ більш складний і непрямий. Наприклад, з'ясовано, що вільний фARNЕСОЛ спричинює прискорену деградацію гідроксиметилглютарил-С-А-редуктази, основного регуляторного ферменту синтезу холестерину та ізопреноїдів (Correll et al., 1994). Це свідчить про можливість участі вільного фARNЕСОЛУ в регуляції сигнальної транс-

ДЛЯ В. Стефанюк  
АН Ужгород

дукції. Незважаючи на те, що інгібування клітинної проліферації фARNесолом та іншими вільними ізопреноїдами має надійне експериментальне підтвердження (Meigs et al., 1995; Ohizumi et al., 1995), механізм цього ефекту ще не з'ясовано.

Мета і задачі дослідження. Основна мета даної роботи полягала у вивченні механізму інгібування клітинної проліферації, спричиненого фARNесолом. Експериментальна стратегія роботи спиралася на висунуту нами гіпотезу про вплив фARNесолу на клітинну проліферацію внаслідок інгібування протеїнкіназа-С-залежної системи трансдукції клітинних сигналів. Для перевірки цієї гіпотези ми поставили перед собою такі задачі:

1. Вивчити кількісні та якісні особливості ефекту фARNесолу на ріст та життєздатність різних клітинних культур; визначити можливий зв'язок смерті клітин, спричиненої фARNесолом, з трансдукцією сигналів та регульованою смертю клітин.

2. Дослідити вплив фARNесолу на метаболічні шляхи синтезу фосфоліпідних посередників протеїнкіназа-С-залежної трансдукції сигналів.

3. Вивчити вплив фARNесолу на регуляцію активності протеїнкінази-С (PKC).

Наукова новизна роботи. Робота є першим систематичним дослідженням по з'ясуванню механізму цитотоксичної дії вільних ізопреноїдів на прикладі фARNесолу. В роботі вперше показано, що цей механізм включає інгібування синтезу вторинних посередників PKC-залежної трансдукції сигналів і відбувається через ініціацію генетично запрограмованого механізму регульованої смерті клітин - апоптозису. На підставі отриманих даних запропоновано механізм регуляції клітинної проліферації, основою якого є фосфорилування - дефосфорилування ізопреноїдів.

В роботі вперше встановлено, що інгібуючий вплив фARNесолу на ріст та життєздатність ракових клітин є значно сильніше виявленим порівняно з клітинами не ракового походження.

Практична цінність роботи. Одержані результати розширюють уявлення про зв'язок попередників синтезу холестерину з процесами регульованої смерті клітин.

Результати роботи можуть бути теоретичною передумовою для використання фARNесолу в антираковій терапії.

Апробація роботи. Основні результати роботи доповідались

на 12-му Міжнародному симпозиумі з глікокон'югатів (Закопане, 1993); щорічних симпозиумах Американського товариства з ракових досліджень (Сан Франциско, 1994; Торонто, 1995); коференції Американського інституту ракових досліджень (Вашингтон, 1994); науковому семінарі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (Київ, 1996).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 друкованих праць.

Об'єм і структура дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 120 сторінках машинописного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури та експериментальної частини, яка містить опис матеріалів та методів досліджень, викладення одержаних результатів та їхнє обговорення, закінчення, висновки та список цитованої літератури, що включає 162 найменування. Робота містить 10 таблиць та ілюстрована 23 рисунками.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.

В роботі були використані культури клітин гострої лейкемії людини SEM-C1 та SEM-C7, карциноми шийки матки людини C-4-1, фібробласти шкіри людини CF-3, ендотеліальні клітини аорти бика BAC та аорти свині PAC, культура клітин нормальної простати людини D.S., промієлоцитні лейкемічні клітини людини HL-60, епітеліодні клітини карциноми шийки матки людини HeLa S3K, клітини карциноми простати людини DU-145, клітини мишачої лімфоми L5178Y-R (канцерогенні) та L5178Y-S (неканцерогенні). Суспензовані клітини SEM-C1, SEM-C7 та HL-60 вирощували в середовищі RPMI 1640 з 10 % інактивованої телячої сироватки (FBS). Моношарові клітини C-4-1, CF-3, HeLa S3K, BAC, PAC, DU-145 та D.S. вирощували в середовищі DMEM з 10 % FBS. L5178Y-R та L5178Y-S вирощували у середовищі Fisher з 10 % конячої сироватки (HS). Всі поживні середовища містили пеніцилін (100 од./мл) та стрептоміцин (100 мг/мл). За 24 години до початку експериментів клітини переносили в середовище Iscove's, яке не містило сироватки. Фарнесол та його аналоги додавали у вигляді етанольного розчину безпосередньо в поживне середовище.

Суспензовані клітини рахували за допомогою Coulter Counter Model B. Кількість моношарових клітин визначали, вимі-

рюючи концентрацію протеїну в клітинному лізаті за методом Лоурі, використовуючи за стандарт БСА. Для визначення життєздатності клітин використовували метод флуоресцентної мікроскопії Jones і Senft (1985) з власними модифікаціями (Naug et al., 1994). Життєздатність СЕМ-С1 клітин також визначали за допомогою цитофлуориметра EPICS 752 після фарбування розчином іодіда пропідія (10 мг/мл) і діоцетата флуоресцеїну ( $5 \times 10^{-7}$  М).

Для вивчення метаболічних перетворень фосфатидилхоліну (ФХ) радіоізотопними методами клітини СЕМ-С1 інкубували на протязі 2 годин з фарнесолом (20 мкМ) та 1 години з хлоридом [метил- $^3\text{H}$ ]-холіну або [ $^3\text{H}$ ]-міристидною кислотою. Після інкубації клітини промивали холодним розчином 0.85 % NaCl з німецькими хлоридом холіну або міристидною кислотою (1 мМ).

Ліпіди екстрагували за методом Bligh і Dyer (1959). В експериментах з міченим хлоридом холіну органічні фази експериментальних зразків висушували у струмі азоту, аліквоти відбирали для визначення сумарної радіоактивності на сцинтиляційному лічильнику Packard 2200 CA. Залишок органічної фази розчиняли в 30 мкл хлороформу з німецьким ФХ та наносили на пластинки для тонкошарової хроматографії, вкриті силікагелем-G, які розганяли в системі хлороформ/метанол/вода (27:12:2 v/v/v). В експериментах з міченою міристидною кислотою для визначення sn-1,2-діацилгліцеролу (ДАГ) зразки органічної фази наносили на пластинки для тонкошарової хроматографії, вкриті силікагелем-60, розганяли в системі гексан/діетиловий ефір/формова кислота (90 %) (60:40:1). Для визначення фосфатидної кислоти та фосфатидилетанолу використовували систему етилоцетат/ізооктан/оцтова кислота/вода (65:10:15:50). Зразки водної фази заморожували, висушували на ліофільній сушарці та розчиняли в метанолі (50 %), який містив в собі німецькі хлорид холіну, фосфохолін та холінцитидиллифосфат (ЦДФ-холін). Зразки наносили на пластинки для тонкошарової хроматографії, вкриті силікагелем-G, та розганяли в системі оцетат амонія (1 М, рН 5.0)/етанол (95 %) (3:7). Ліпідні плями проявляли в парах йоду, зчищали та вимірювали їхню радіоактивність на сцинтиляційному лічильнику.

Для визначення ДАГ з клітин, інкубованих з фарнесолом (20 мкМ), ліпіди екстрагували за методом Bligh і Dyer (1959). ДАГ

визначали за допомогою Assay Reagent System (Amersham). Основою методу є реакція перетворення ДАГ у [ $^{32}\text{P}$ ]-фосфотидну кислоту в присутності [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]АТФ та ДАГ-кінази. [ $^{32}\text{P}$ ]-фосфотидна кислота визначалася за допомогою тонкошарової хроматографії. Пластинки, вкриті силікагелем-G, розганяли в системі хлороформ/метанол/оцтова кислота (13:3:1), використовуючи за стандартом немічену фосфотидну кислоту.

Активність холінфосфатцитидилтрансферази (ХТ) вимірювали за методом Sleight і Kent (1980) в 20 мМ трис/сукцинат буфері (рН 7.8), який містив 6 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 8 мМ ЦФ, 4 мМ [ $^{14}\text{C}$ ]-фосфохолін (0.4 Сі/М) та 0 - 80 мкг протеїну. Кількість мічених ЦДФ-холіну та фосфохоліну визначали за допомогою сцинтиляційного лічильника після тонкошарової хроматографії, як описано вище.

Активність холінфосфотрансферази (ЦФТ) вимірювали за методом Sleight і Kent (1980) в 175 мМ трис/ $\text{HCl}$  буфері (рН 8.5), який містив 8 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 мМ ЕГТА, 1 мг/мл БСА і 2 мМ ДАГ в 0.1% розчині таурохолату, 0.1 мМ [ $^{14}\text{C}$ ]-ЦДФ-холін та 0 - 25 мкг протеїну. Після розділення фаз радіоактивність органічної фази вимірювали на сцинтиляційному лічильнику.

Для визначення ПКС за допомогою Вестерн блоту клітини ліній CF-3 і HeLaS3K інкубували з фарнесолом (20 мкМ) і/або РМА (200 нМ) та збирали, зчищаючи в холодному лізуючому буфері (25 мМ трис- $\text{HCl}$  (рН 7.5) з 2 мМ ЕДТА, 0.5 мМ ЕГТА, 1 М дитіотреїтолом (ДТТ), 20 мкг/мл лейпептином, 20 мкг/мл апротеніном, 1 мМ поліметилсульфонілфлуоридом). Зібрані клітини гомогенізували на кризі в гомогенізаторі Даунса (30 циклів). Гомогенати центрифугували 30 хвилин (100.000 g); отримані супернатанти (цитозольні фракції) збирали. Осади ресуспендували в 1 мл лізуючого буферу з тритоном X-100 (1 %), додатково ресуспендували за допомогою ультразвукового диспергатора та центрифугували 30 хвилин (100.000 g); отримані супернатанти (мікросомальні фракції) збирали. Концентрації протеїнів у зразках визначали за допомогою методу БСА, використовуючи за стандарт БСА. Протеїн (50 мкг) з кожної фракції наносили на градієнтний 4-20 % SDS-поліакриламідний гель. Електрофорез проводили за методом Леммлі при денатуруючих умовах. Після електрофорезу білки електрофоретично переносили з гелю на нітроцелюлозну мембрану.

Мембрану блокували в розчині нежирного сухого молока (0.1 %) з Твіном 20 (0.1 %) протягом ночі. Мембрану інкубували з мишачими моноклональними анти-ПКС антитілами MC-5 та козячим антимишачим імуноглобуліном, кон'югованим з пероксидазою. Мембрану проявляли хемілюмінесцентним реагентом.

Виділення ДНК проводили за методом Compton і Cidlowski (1986). До клітин, зібраних після інкубації з фарнесолом (20 мкМ), додавали 1 мл розчину протеїнази К (1 мг/мл) в 10 мМ трис-НСl буфері (рН 7.5) з 150 мМ NaCl, 10 мМ ЕДТА, 0.4 % SDS та інкубували 30 хвилин при 65°C і додатково 16 годин при 37°C на качалці. ДНК виділяли екстрагуванням в суміші хлороформ/фенол/ізоаміловий спирт (25:25:1), очищали в діетиловому ефірі, насиченому водою, та діалізували при 0°C проти 10 мМ трис-НСl буферу (рН 7.5) з 1 мМ ЕДТА. Після діалізу до зразків додавали розчин РНКаз (10 мг/мл), вільної від ДНКаз, та інкубували 5 годин при 37°C. Фенольно-хлороформну екстракцію ДНК повторювали. Концентрацію та чистоту ДНК визначали за допомогою спектрофотометра. 25 мкг ДНК кожного зразка наносили на 1.8 % агарозний гель, до складу котрого входив бромід етидію (0.4 мкг/мл). Фрагментовану ДНК з довжиною фрагментів, кратною 123 пар основ, використовували за стандарт. Гель фотографували в ультрафіолетових променях.

Для цитофлуориметрії ДНК фарбували розчином іодиду пропідія, поперед фіксуєчи клітини 10 хвилин в етанолі при 0°C. Фіксовані клітини осаджували центрифугуванням, фіксуєчий розчин зливали і клітини фарбували в розчині цитрату натрію (1 мг/мл) з 0.3 % NP40 та 0.02 мг/мл РНКаз. Фіксовані та пофарбовані ядра аналізували в цитофлуориметрі EPICS 752, обладнаному аргоновим лазером. Довжина хвилі збуджуючого випромінювання була 488 нм. Емісію від пофарбованих ядер вимірювали в проміжку від 615 до 645 нм.

#### РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.

На першому етапі наших досліджень ми показали, що фарнесол пригнічує ріст та життєздатність різних типів клітин. В семи ракових культурах клітин та п'яти неракових 10-45 мкМ фарнесол інгібував ріст клітин та викликав їхню смерть на протязі 24-72 годин інкубації. При цьому вплив фарнесолу на рако-

ві клітини був значно сильніше, як порівняти з нормальними клітинами. Так, експерименти з нераковими (CF-3 і PAC) та неопластичними клітинами (HeLa і C-4-1) свідчили про достовірну різницю в чутливості цих клітинних ліній до фарнесолу після 72 годин інкубації (Рис. 1). Ці дані також узгоджуються із впливом фарнесолу на життєздатність клітин SEM-C1, виміряну за допомогою різних методів (Табл. 1).

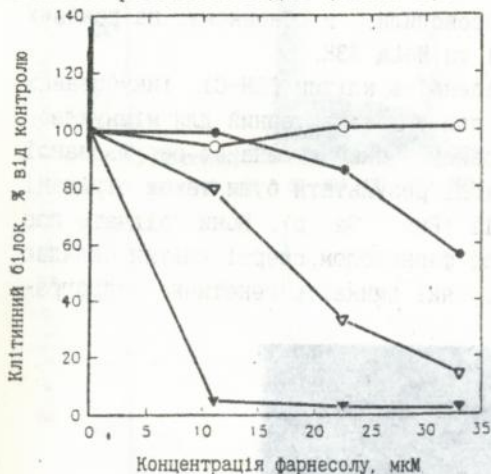


Рис. 1. Вплив фарнесолу в різних концентраціях на ріст клітин після 72 годин інкубації.  
 ○ - CF-3; ● - PAC;  
 ▽ - HeLa; ▼ - C-4-1

Таблиця 1

Вплив фарнесолу на кількість і життєздатність клітин SEM-C1 в залежності від його концентрації

Зразок	Кількість клітин		Життєздатність клітин	
	Всі клітини, %	Клітини норм. розміру, %	Мікроскопія, % живих, M+m	Цитофлуориметрія, % живих, M+m
Контроль	100	95	94.2+1.4	94.2+0.7
Фарнесол				
10 мкМ	88	93	94.5+1.7	93.4+1.4
20 мкМ	71	87	91.5+3.0	92.8+1.3
22 мкМ	72	89	89.0+3.6	92.2+1.6
25 мкМ	69	85	84.0+8.1	89.3+1.5
29 мкМ	5	35	9.0+3.2	6.8+2.3
30 мкМ	1	18	0.6+0.8	0.7+0.7

Така різниця у виявленій токсичності фарнесолу може бути пов'язана з різною швидкістю метаболізму в ракових та нормальних клітинах. Відомо, що більш активні метаболічно-ракові клітини також більш чутливі до будь-яких порушень метаболічних процесів. Таким чином, отримані результати свідчать за те, що механізм токсичного впливу фарнесолу виявляється на рівні клітинного метаболізму.

Подальші експерименти проводили, в основному, на ракових клітинах двох ліній - СЕМ-С1 та HeLa S3K.

Електрофорез ДНК, виділеної з клітин СЕМ-С1, інкубованих з фарнесолом, виявив набір полос, характерний для міжнуклеосомної фрагментації - апоптозису, який є ознакою регульованої смерті клітин (Рис. 2). Подібні результати були також отримані за допомогою цитофлуориметрії (Рис. 3а, б). Вони свідчать про те, що механізм викликаного фарнесолом смерті клітин складає низку метаболічних процесів, які вмикають генетично запрограмований механізм апоптозису.

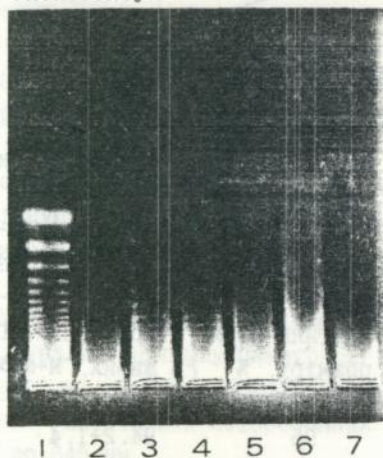


Рис. 2. Агарозний гель-електрофорез ДНК з клітин СЕМ-С1. 2, 7 - контроль (24, 48 год.); 3, 4 - 29 мкМ фарнесол (24, 48 год.); 5 - 30 мкг/мл ФХ (24 год.); 6 - 29 мкМ фарнесол з 30 мкг/мл ФХ (24 год.)

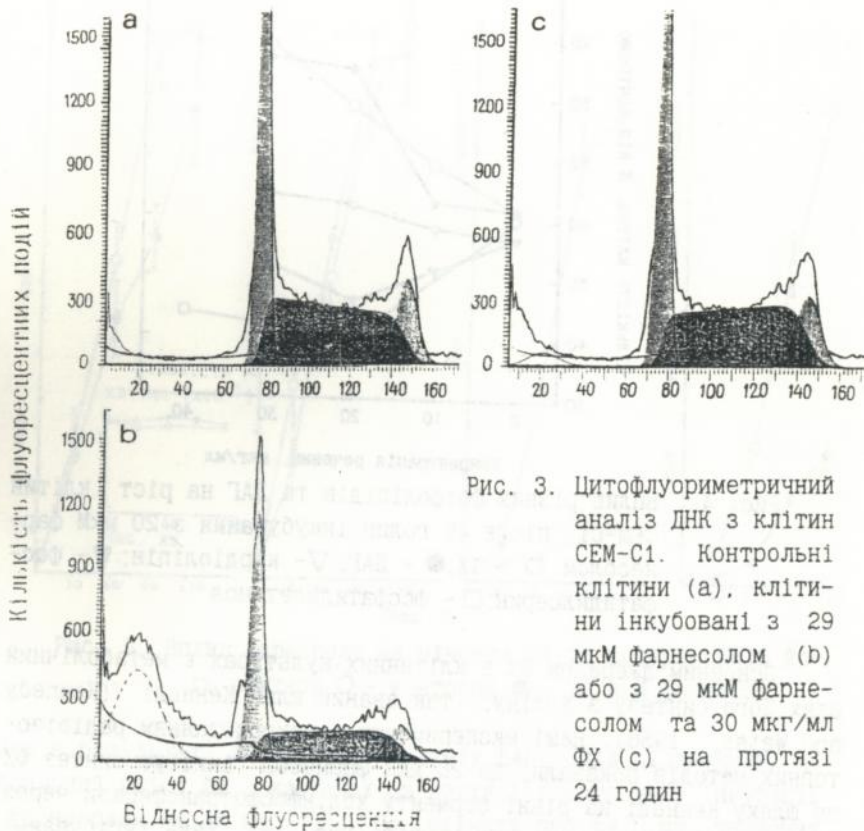


Рис. 3. Цитофлуориметричний аналіз ДНК з клітин СЕМ-С1. Контрольні клітини (а), клітини інкубовані з 29 мкМ фарнесолом (b) або з 29 мкМ фарнесолом та 30 мкг/мл ФХ (с) на протязі 24 годин

В попередніх дослідженнях (Melnykovych et al., 1992) було показано, що найбільш значим ефектом фарнесолу на метаболізм клітин є його вплив на синтез ліпідів, зокрема, фосфатидилхоліну та діацилгліцеролу. Спираючись на ці дані ми показали, що з найбільш поширених клітинних ліпідів лише ФХ та ДАГ здатні блокувати інгібуючу дію фарнесолу на ріст клітин СЕМ-С1 (Рис. 4). Як відомо, ДАГ є метаболічним продуктом ФХ. Таким чином, це підтверджує наші припущення про те, що механізм цитотоксичності фарнесолу полягає у його дії на синтез та деградацію ФХ. Це також підтверджується одержаними нами даними про здатність ФХ блокувати апоптичну фрагментацію ДНК (Рис. 2, 3с).

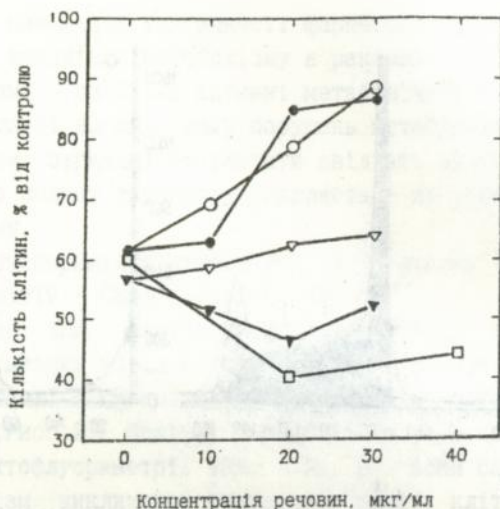


Рис. 4. Вплив різних фосфоліпідів та ДАГ на ріст клітин СЕМ-С1 після 48 годин інкубування з 20 мкМ фарнесолом. ○ - ФХ; ● - ДАГ; ▽ - кардіоліпін; ▼ - фосфатидилсерин; □ - фосфатидилетанол

Основним джерелом ФХ в клітинних культурах є метаболічний шлях його синтезу з холіну, так званий шлях Кеннеді (Kennedy and Weiss, 1956). Наші експерименти з використанням радіоізотопних методів показали, що 20 мкМ фарнесол інгібує синтез ФХ по шляху Кеннеді на рівні ферменту холінфосфотрансферази через 30-60 хвилин від початку інкубації (Рис. 5). Таке інгібування відбувалося опосередковано і вимагало присутності індукованого фарнесолом термостабільного низькомолекулярного цитозольного компоненту.

Фарнесол також інгібує деградацію клітинного ФХ і, відповідно, знижує синтез ДАГ. Дані, одержані в цих експериментах і представлені на Рис. 6, свідчать про те, що основні ферменти, які забезпечують деградацію ФХ, фосфоліпаза С (ФЛС) та фосфоліпаза D (ФЛD), інгібуються в присутності фарнесолу. При цьому активність ФЛС знижується приблизно через 1 годину після додавання фарнесолу до клітин; зниження активності ФЛD потребує подовженої інкубації - приблизно 2 години. Таким чином, інгібування фарнесолом трьох ферментів - ЦФТ, ФЛС та ФЛD - призво-

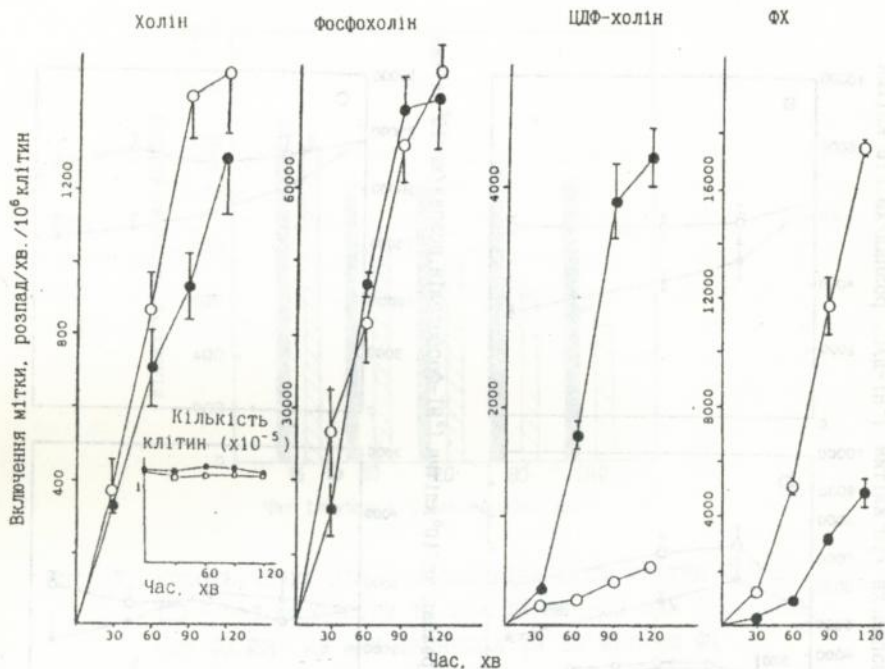


Рис. 5. Вплив фарнесолу на мічення ФХ та попередників його синтезу. ○ - контроль, ● - 20 мкМ фарнесол

дить в результаті до зниження синтезу ДАГ. Слід відзначити, що загальний вміст ФХ в клітинах на протязі всього часу інкубації з фарнесолом не змінювався. Це свідчить про те, що зниження синтезу РС під впливом фарнесолу має регуляторне значення і таке зниження не впливає на структурну цілісність клітинних мембран.

Як було згадано вище, екзогенний ФХ здатен блокувати інгібуючу дію фарнесолу на ріст клітин. Однак, така дія ФХ проявляється лише, якщо його додавати до клітин протягом перших 60 хвилин інкубації з фарнесолом, тобто до того моменту, коли спостерігається помітне інгибування біосинтезу ФХ (Рис. 7). Таким чином, зниження синтезу ФХ та ДАГ вмикає процес, котрий не може бути зупинений простим підвищенням рівня цих ліпідів в клітинах. Ми показали, що таким процесом є інгибування активності ПКС. Після того, як синтез ДАГ - фізіологічного актива-

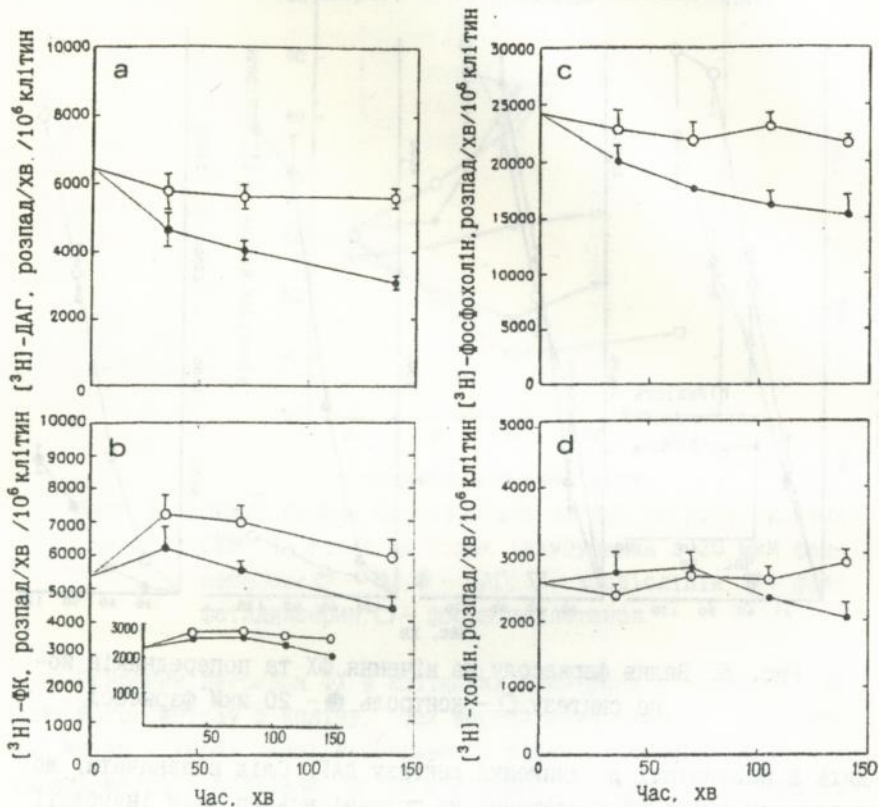


Рис. 6. Вплив фарнесолу на мічення ДАГ (а), фосфатидної кислоти (б), фосфохоліну (с) та холіну (д) в клітинах SEM-C1, преінкубованих з [<sup>3</sup>H]-міристидною кислотою (а, б) або [<sup>3</sup>H]-холіном (с, д).

○ - контроль, ● - 20 мкМ фарнесол

тора ПКС - знижується,  $\alpha$  та  $\beta$  ізоформи ферменту переходять з мембранозв'язаної, активної, форми в цитозольну, неактивну (Рис. 8). Відомо, що така інактивація ПКС здатна ініціювати фрагментацію ДНК і веде до апоптотичної смерті клітин (Falcieri et al., 1993; Sanchez-Margalet et al., 1993).

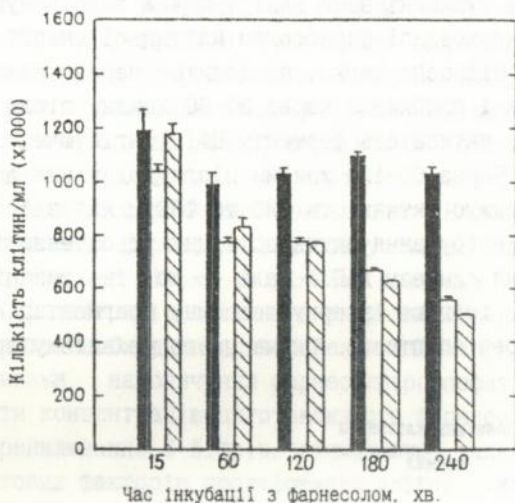


Рис. 7. Короткочасна дія фарнесолу на ріст клітин СЕМ-С1.  
 □ - без фарнесолу та без ФХ; ■ - 29 мкМ фарнесол, без ФХ; ▨ - 29 мкМ фарнесол та 30 мкг/мл ФХ

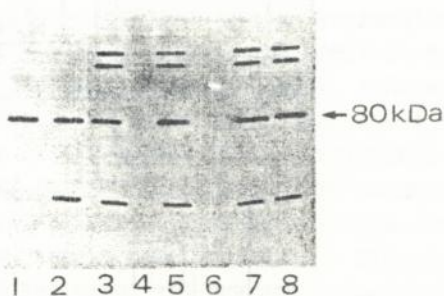


Рис. 8. Вплив 20 мкМ фарнесолу на розподіл ПКС між цитозольною (непарні лінії) та мікросомальною (парні лінії) фракціями клітин HeLa S3K. 1, 2 - контроль (24 години); 3, 4 - 20 мкМ фарнесол (1 година); 7, 8 - 200 нМ РМА (30 хвилини); 5, 6 - 20 мкМ фарнесол та 200 нМ РМА (30 хвилини)

Узагальнюючи отримані нами дані, можна запропонувати такий механізм індукованої фARNесолом клітинної смерті. Липофільний фARNесол відносно легко проходить через плазматичну мембрану клітини і приблизно через 30-60 хвилин після початку інкубації знижує активність ферменту ЦФТ, інгібуючи таким чином синтез ФХ. Через 60-120 хвилин після додавання до клітин фARNесол також знижує активність ФЛС та ФЛД, які забезпечують деградацію ФХ. Інгібування активності цих трьох ензимів призводить до зниження синтезу ДАГ і далі - до інактивації ПКС. Це, в свою чергу, ініціює інтернуклеосомну фрагментацію ДНК та смерть клітин через апоптозис. Схема цього механізму представлена на Рис. 9.

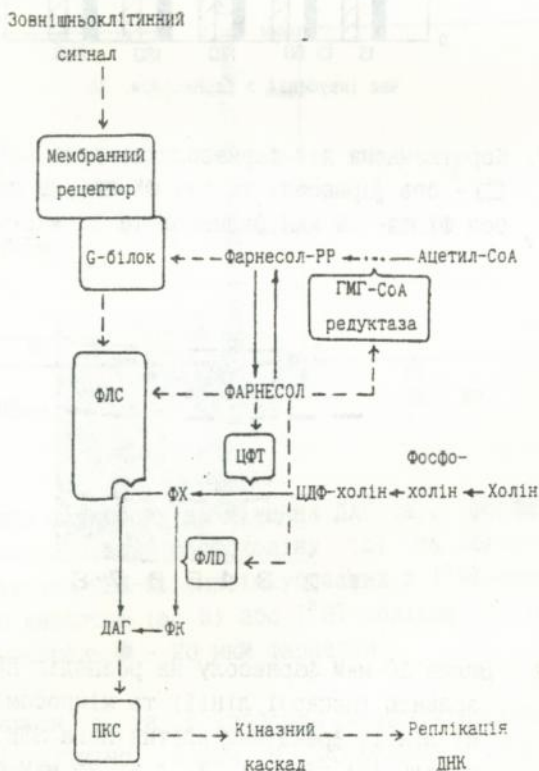


Рис. 9. Регуляторна роль фARNесолу в ПКС-залежній трансдукції клітинних сигналів

Недавно було показано, що вільний фарнесол прискорює деградацію ГМГ-СоА-редуктази - ключового ферменту мевалонатного шляху синтезу фосфорильованих ізопrenoїдів (Correll et al., 1994). Разом з запропонованим в цій роботі механізмом цитотоксичності фарнесолу ці два процеси можуть забезпечувати регуляцію клітинної проліферації та клітинної смерті на рівні фосфорильовання - дефосфорильовання фарнесолу. Насправді, прискорене дефосфорильовання фарнесолпірофосфату та накопичення вільного фарнесолу буде не тільки ініціювати клітинну смерть, але також зупиняти проліферацію клітин, зменшуючи концентрацію фарнесолпірофосфату, необхідного для забезпечення сигнальної трансдукції. Навпаки, накопичення фарнесолпірофосфату буде не тільки зменшувати концентрацію цитотоксичного фарнесолу, а й забезпечувати пренилювання G-білків, стимулюючи, таким чином, залежну від ростових факторів проліферацію клітин. Можна припустити, що подібний механізм включає не тільки вільний фарнесол та фарнесолпірофосфат, а й інші ізопrenoїди. У зв'язку з цим заслуговує на увагу нещодавнє повідомлення про цитотоксичність вільного жеранілжеранолу (Ohizumi et al., 1995).

#### ВИСНОВКИ.

1. Фарнесол інгібує ріст та знижує життєздатність 12 використаних в роботі культур клітин. Цей ефект особливо виражений щодо ракових культур: клітин гострої лейкемії людини SEM-C1 та SEM-C7, карциноми шийки матки людини C-4-1, промієлоцитних лейкемічних клітин людини HL-60, епітелоїдних клітин карциноми шийки матки людини HeLa S3K, клітин карцином простати людини DU-145, клітин мишачої лімфоми L5178Y-R (канцерогенних). Культури клітин неракового походження - фібробласти шкіри людини CF-3, ендотеліальні клітини аорти бика BAC та аорти свині PAC, клітини нормальної простати людини D.S., клітини мишачої лімфоми L5178Y-S (неканцерогенні) - виявили меншу чутливість до токсичності фарнесолу.

2. Найбільш раннім метаболічним ефектом фарнесолу (30-60 хвилин) є зниження швидкості біосинтезу клітинного фосфатидилхоліну за рахунок інгібування активності ферменту холінфосфотрансферази. Це інгібування відбувається опосередковано через метаболіт фарнесолу або активований ним посередник, котрий на-

копичується в цитозолі.

3. Фарнесол знижує швидкість деградації фосфатидилхоліну, інгібуючи фосфоліпазу С через 1 годину після додавання до культури клітин. Фосфоліпаза D також інгібується фарнесолом, але після більш тривалої інкубації - біля 2 годин. Така дія фарнесолу приводить до помітного зниження синтезу  $DA\Gamma$  - вторинного посередника та фізіологічного активатора ПКС.

4. Фарнесол стимулює перехід ПКС з її активної, мембранозв'язаної форми в неактивну, цитозольну форму.

5. Ці метаболічні ефекти фарнесолу призводять до міжнуклеосомної фрагментації ДНК та клітинної смерті через апоптозис.

#### СПИСОК РОБИТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. G. Melnykovych, P.A. Voziyan, J.S. Haug, Ch.M. Goldner, E.M. Yazlovitskaya. Effect of farnesol on growth and phospholipid biosynthesis in CEM-C1 line of human acute lymphoblastic leukemia // Abstracts of the Satellite Meeting to the 12th International Symposium on Glucoconjugates. - Zakopane, 1993. - P. 53.

2. P.A. Voziyan, J.S. Haug, E.M. Yazlovitskaya, I. Adany, G. Melnykovych. Farnesol induces apoptosis in cultured cells: comparison of neoplastic and non-neoplastic cells // Proceedings of the American Association for Cancer Research, V. 35 - San Francisco, CA, 1994. - P. 1.

3. J.S. Haug, Ch.M. Goldner, E.M. Yazlovitskaya, P.A. Voziyan, G. Melnykovych. Directed cell killing (apoptosis) in human lymphoblastoid cells incubated in presence of farnesol: effect of phosphatidylcholine // Biochim. Biophys. Acta - 1994. - 1223 - P. 133-140.

4. I. Adany, E.M. Yazlovitskaya, J.S. Haug, P.A. Voziyan, G. Melnykovych. Differences in sensitivity to farnesol toxicity between neoplastically and non-neoplastically-derived cells in culture // Cancer Lett. - 1994. - 79. - P. 175-179.

5. G. Melnykovych, P.A. Voziyan, J.S. Haug, E.M. Yazlovitskaya. Mechanism of farnesol-induced apoptotic cell death may involve PKC-dependent signal transduction pathway // Proceedings of the American Association for Cancer Research, V. 36 - Toronto, Ontario, 1995. - P. 4.

6. E.M. Yazlovitskaya, G. Melnykovych. Toxic effect of farnesol on cell viability is preceded by inhibition of protein kinase C (PKC) activity: differences between neoplastic HeLaS3K cells and non-neoplastic CF-3 cells /Diet and cancer. Molecular mechanisms of interactions. - Plenum Press, New York and London, 1995. - P. 199.

7. E.M. Yazlovitskaya, G. Melnykovych. Selective farnesol toxicity and translocation of protein kinase C in neoplastic HeLaS3K and non-neoplastic CF-3 cells // Cancer Lett. - 1995. - 88. - P. 179-183.

Язловицкая Е.М. Протеинкиназа-С-зависимый механизм ингибирования клеточной пролиферации под действием фарнесола. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 1996.

В диссертационной работе рассмотрен механизм действия изопреноида фарнесола на различные линии клеток. Показано, что фарнесол ингибирует рост и снижает жизнеспособность клеток; этот эффект особенно проявляется в раковых клетках. Наиболее ранним метаболическим действием фарнесола является снижение скорости биосинтеза клеточного фосфатидилхолина за счет ингибирования холинфосфотрансферазы. Фарнесол также уменьшает скорость деградации фосфатидилхолина, последовательно ингибируя фосфолипазу С и фосфолипазу D, что приводит к снижению синтеза диацилглицерола - активатора протеинкиназы-С. Протеинкиназа-С переходит из активной, мембраносвязанной формы в неактивную, цитозольную. Такое действие фарнесола на метаболизм клетки приводит к межнуклеосомной фрагментации ДНК и клеточной смерти - апоптозису.

Yazlovitskaya E.M. Protein kinase C-dependent mechanism of inhibition of cellular proliferation by farnesol. The dissertation Thesis for Obtaining a Scientific Degree of Philosophy Doctor (Biology) in the Speciality 03.00.04 - Biochemistry, Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science of Ukraine, Kyiv, 1997.

The dissertation deals with the effect of farnesol on cell growth and proliferation. This effect is more pronounced in neoplastic cells. The early effect of farnesol on cell metabolism is the inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis by decreasing cholinephosphotransferase activity. Farnesol also inhibits phosphatidylcholine degradation by consecutively decreasing phospholipase C and phospholipase C activity. This leads to reduced level of diacylglycerol, activator of protein kinase C. Protein kinase C changes from active membrane-bound form to inactive cytosolic form. These metabolic effects of farnesol cause internucleosomal fragmentation of DNA and cellular death through apoptosis.

Ключові слова: фарнесол, культури клітин, токсичність фарнесолу, біосинтез та деградація фосфатидилхоліну, вторинні посередники, трансдукція сигналів, фосфоліпаза С та D, протеїнкіназа-С, апоптозис.

*EMAS*

---

Підписано до друку 12.02.97 Формат 60x84/16. Папір друк.  
 Офсетний друк. Ум.фарбовідб. 6. Ум.друк.арк.1,16. Обл.-вид. арк. 1,25.  
 Тираж 100 прим. Замовлення № 15-6. Ціна Вид. № 24/IV.

Видавництво КМУЦА  
 252058. Київ-58, проспект Космонавта Комарова,1.