

Влияние ингибиторов убиквитиновой системы на метаболизм кофилина

Научный руководитель – Гайнуллин Мурат Рушанович

Козина Наталья Сергеевна

Аспирант

Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

E-mail: Naterruna@yandex.ru

Введение

Кофилин (Кф) - небольшой повсеместно распространённый внутри клетки белок (~18,5 kDa), являющийся регулятором клеточной подвижности [1]. Он, в свою очередь, контролируется сложной многокомпонентной системой. В том числе, одним из его регуляторов является убиквитин. Система убиквитин-зависимой регуляции белков отличается широкими возможностями коррекции с помощью экзогенных веществ [2]. По этой причине система убиквитина рассматривается на настоящий момент как перспективная мишень действия новых лекарственных средств. Целью данной работы было изучение изменения внутриклеточной концентрации Кф в ответ на воздействие на клетки ингибиторами убиквитин-зависимых процессов.

Материалы и методы

Для оценки степени изменений концентрации Кф, клетки линии НЕК293 инкубировались с ингибитором протеасомы MG-132 и ингибитором деубиквитилирующих ферментов PR-619 [3]. В контрольных экспериментах клетки инкубировались с DMSO. После лизиса клеток образцы инкубировались при температуре 37°C 30 минут, 1 час и 4 часа соответственно. Оценка уровня мономерного Кф, а также его средне- и высокомолекулярных форм проводилась методом иммуноблоттинга с моноклональными антителами к кофилину и моноклональными антителами к убиквитину.

Результы

По данным иммуноблоттинга, в лизатах клеток НЕК293, помимо полосы иммунореактивности 18,5 kDa, детектируется также сигнал анти-кофилиновых антител в средне- и высокомолекулярной области (~50 кДа и выше 90 кДа). Эти же белки демонстрируют перекрестную иммунореактивность при анализе с антителами к убиквитину. Это позволяет предположить, что детектируемые протеоформы представляют собой Кф, модифицированный мультиубиквитиновыми цепями.

Нами было показано, что и мономерный, и убиквитилованный Кф, в условиях эксперимента деградирует во времени. При этом мономерный Кф в лизатах деградирует значительно быстрее, чем модифицированный убиквитиновыми цепями. Уровень мономерного Кф в опытных образцах падает быстрее, чем в контрольных: через 4 ч. в опытных образцах она составляет 10% от начального значения, в контрольном - 50%. Под воздействием PR-619 происходит также значительное накопление среднемолекулярного Кф.

Выводы:

Нами показана высокая лабильность внутриклеточного Кф. Воздействие на клетки НЕК293 как ингибитора протеасом MG-132, так и ингибитора деубиквитилирующих ферментов PR-619 приводит к увеличению скорости деградации. Накопление среднемолекулярного Кф под воздействием PR-619 при отсутствии подобного эффекта в эксперименте с MG-132 говорит о непротеасомальном характере деградации.

Источники и литература

- 1) Bravo-Corder Jose Javier, Magalhae Marco A. O. et all. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion// Nature Reviews Molecular Cell Biology, AOP, 2013
- 2) Chernorudskiy Alexander L. and Gainullin Murat R. Ubiquitin System: Direct Effects Join the Signaling// Science Signaling 6 (280), 2013
- 3) Hoi-Man Ng, Leizhen Wei et all. The K63-Deubiquitylating Enzyme BRCC36 Limits DNA break Processing and Repair// JBC Papers in Press. 2016