

КОН'ЮГАЦІЯ УБІКВІТИНА ІЗ ПРОТЕЇНАМИ РОДИНИ MRPS18 ТА КІНЕТИКА ЇХ ДЕГРАДАЦІЇ *IN VITRO*

ФЕШИНА М. О., КОВАЛЕВСЬКА О.В., КАШУБА О.В.

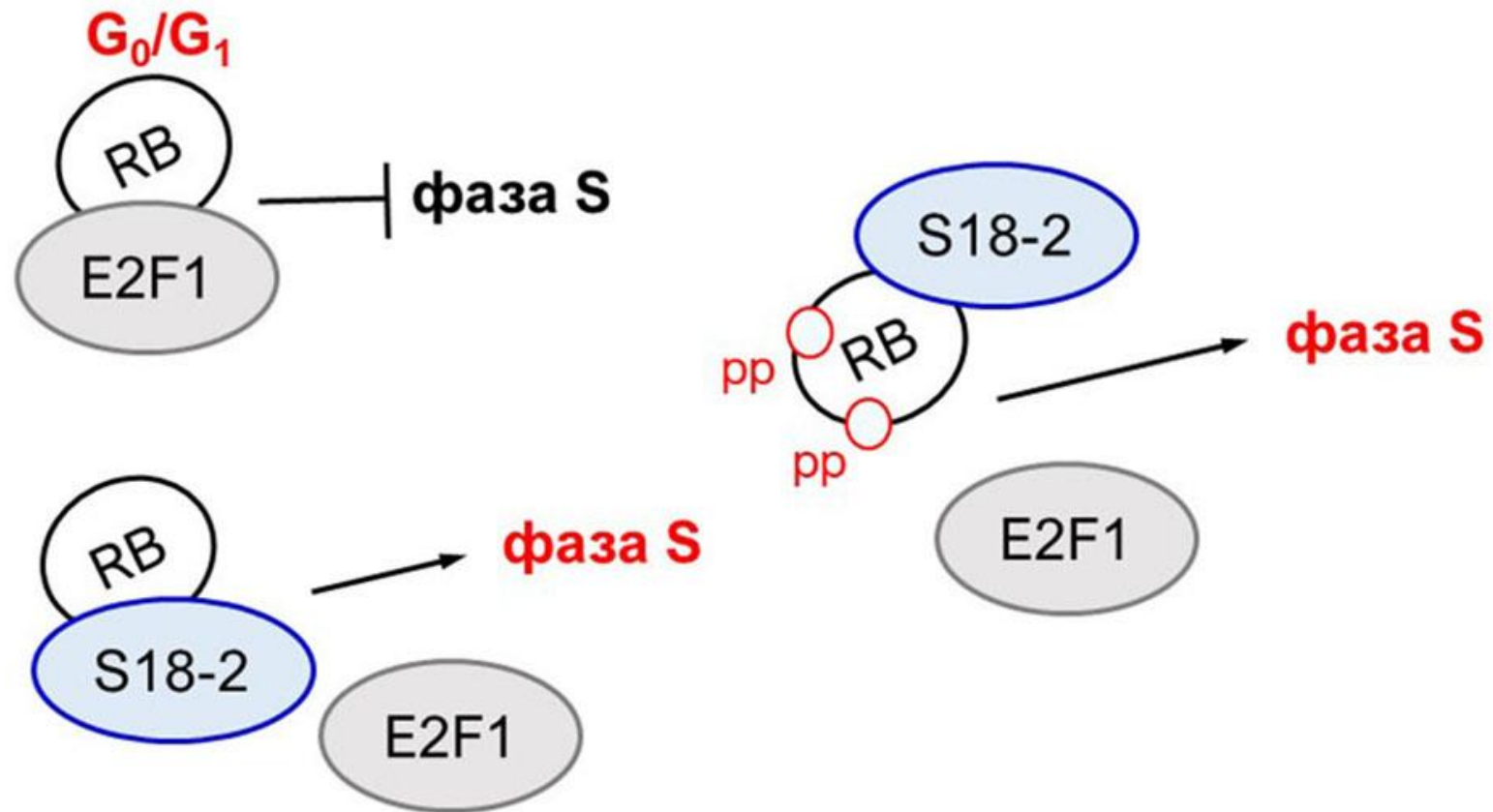
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ ТА РАДІОБІОЛОГІЇ

ІМ. Р.Є.КАВЕЦЬКОГО НАН УКРАЇНИ, КИЇВ, УКРАЇНА

План проведення роботи

1. Синтез протеїнів родини MRPS18 *in vitro*;
2. Проведення кон'югацію убіквітина із протеїнами родини MRPS18 *in vitro*;
3. Вивчення кінетики деградації протеїнів MRPS18 *in vitro*;
4. Підтвердження можливості убіквітинування білків родини MRPS18 *in vivo*.

Шлях RB-E2F1

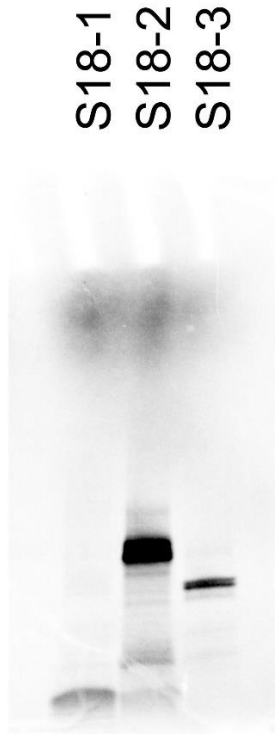


S18-2 – онкопротеїн

1. Бере участь у регуляції RB-залежного клітинного шляху;
2. Його висока концентрація спостерігається у злоякісних клітинах ряду пухлин:
 - a. ендометрію;
 - b. товстого кишківника;
 - c. передміхурової залози;
 - d. грудної залози;
 - e. гепатоцелюлярної карциноми.

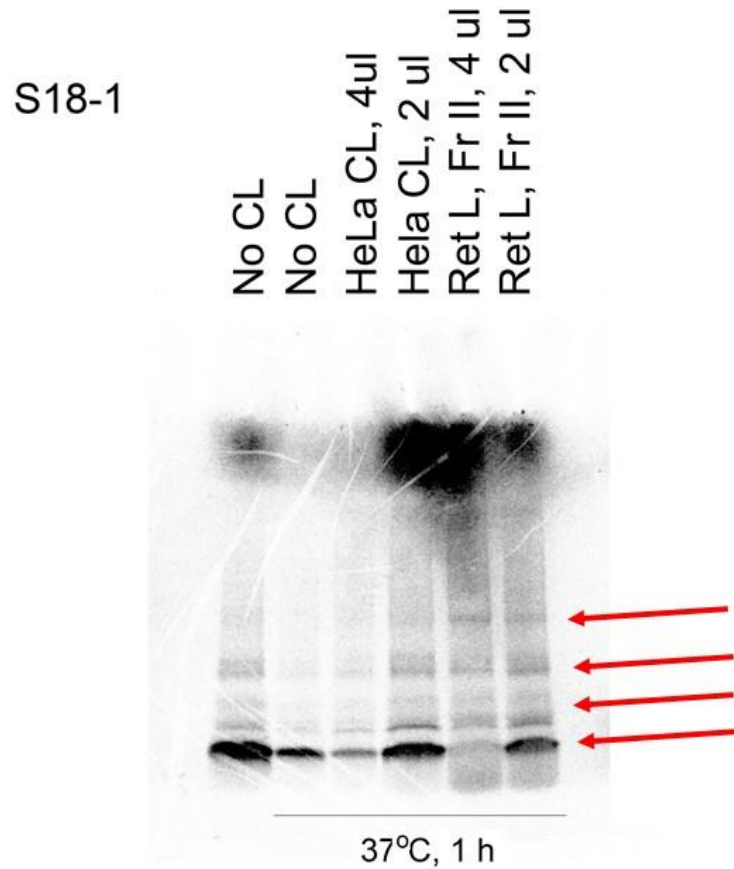
Трансляція протеїнів *in vitro* з конструктів у векторі pGEM

S18-1 (C): 15,9 kDa
S18-2 (B): 29,3 kDa
S18-3 (A): 22,2 kDa



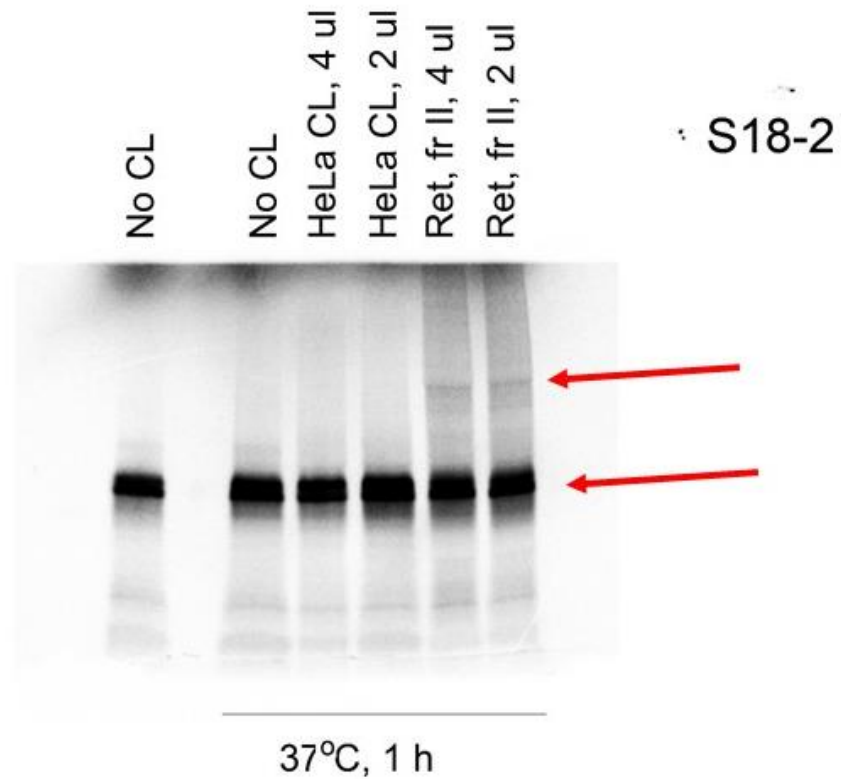
Гель-електрофорез білків, який демонструє успішність трансляції білків на основі інкорпорації метіоніну, міченого S35, у амінокислотну послідовність протеїнів

Убіквітинування S18-1 *in vitro*



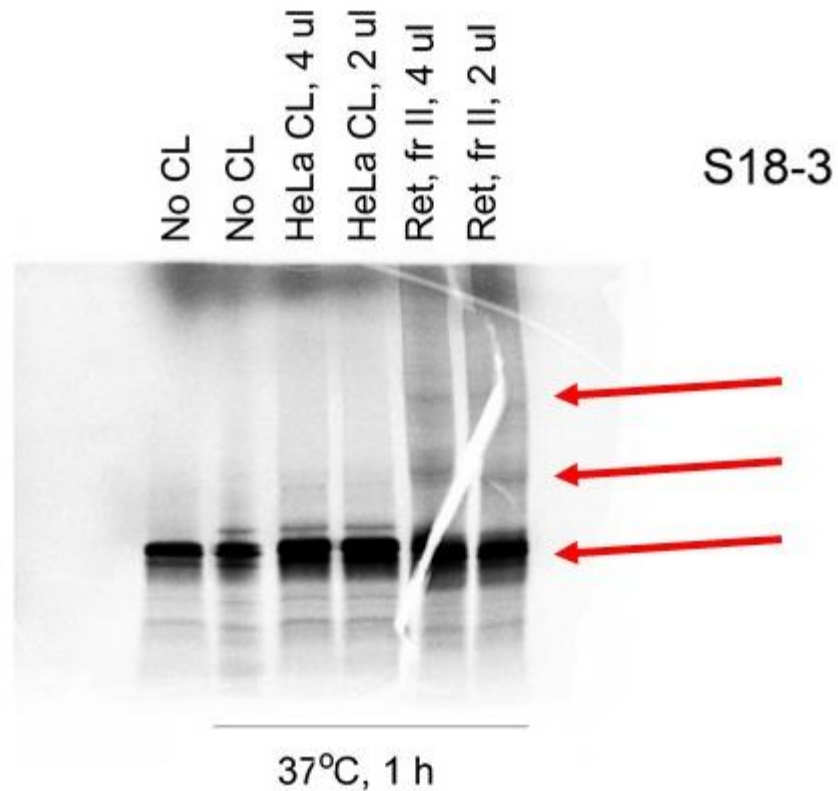
Кон'югація убіквітину до білка S18-1, отриманого за допомогою трансляції *in vitro*. Стрілками вказано положення оліго–(полі)-убіквітину.

Убіквітинування S18-2 *in vitro*



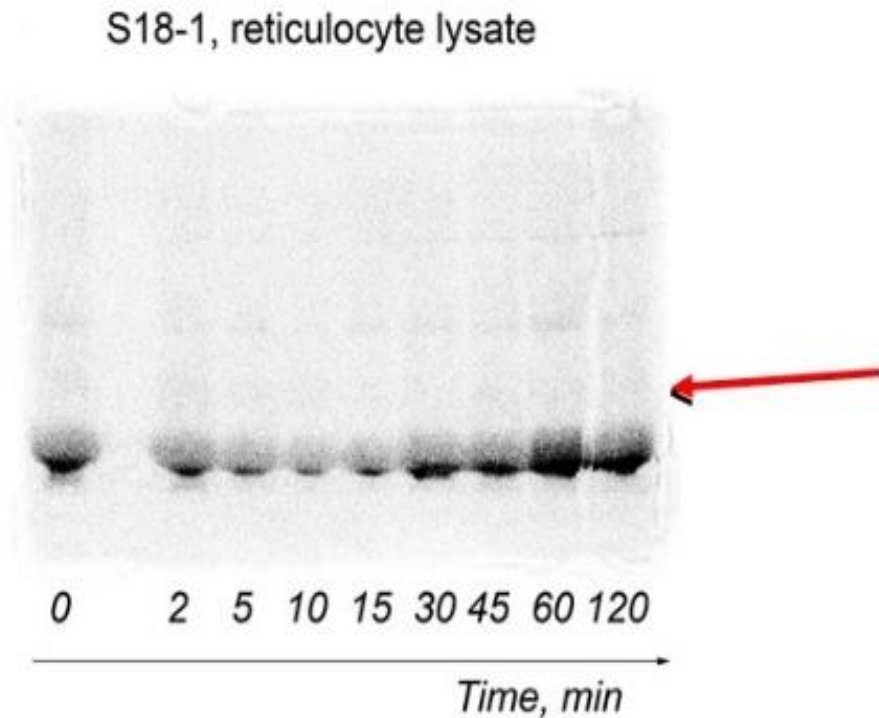
Кон'югація убіквітину до білка S18-2, отриманого за допомогою трансляції *in vitro*. Стрілками вказано положення оліго–(полі)-убіквітину.

Убіквітинування S18-3 *in vitro*



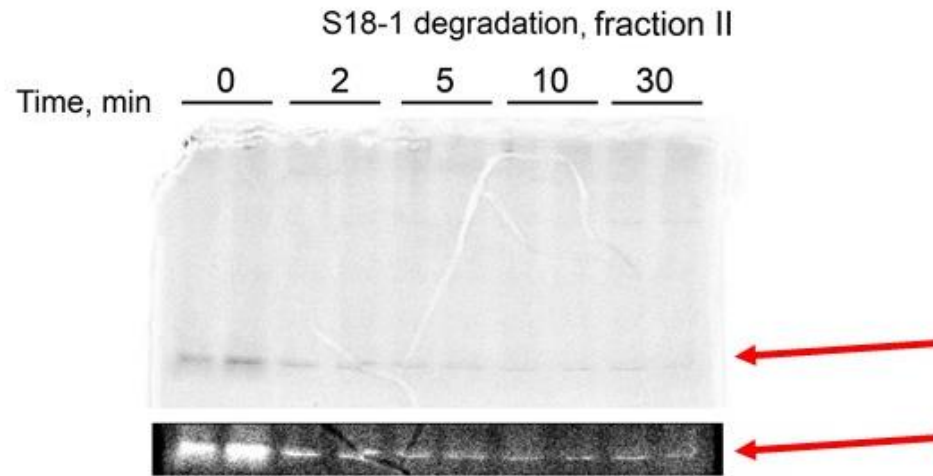
Кон'югація убіквітину до білка S18-3, отриманого за допомогою трансляції *in vitro*. Стрілками вказано положення оліго- (полі)-убіквітину.

Деградація S18-1 *in vitro*

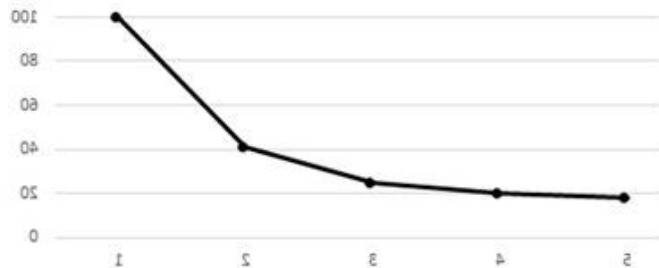


Деградація білка S18-1, отриманого за допомогою трансляції *in vitro* за участю лізатів ретикулоцитів. Стрілкою вказано положення полоски протеїна до деградації.

Деградація S18-1 *in vitro*

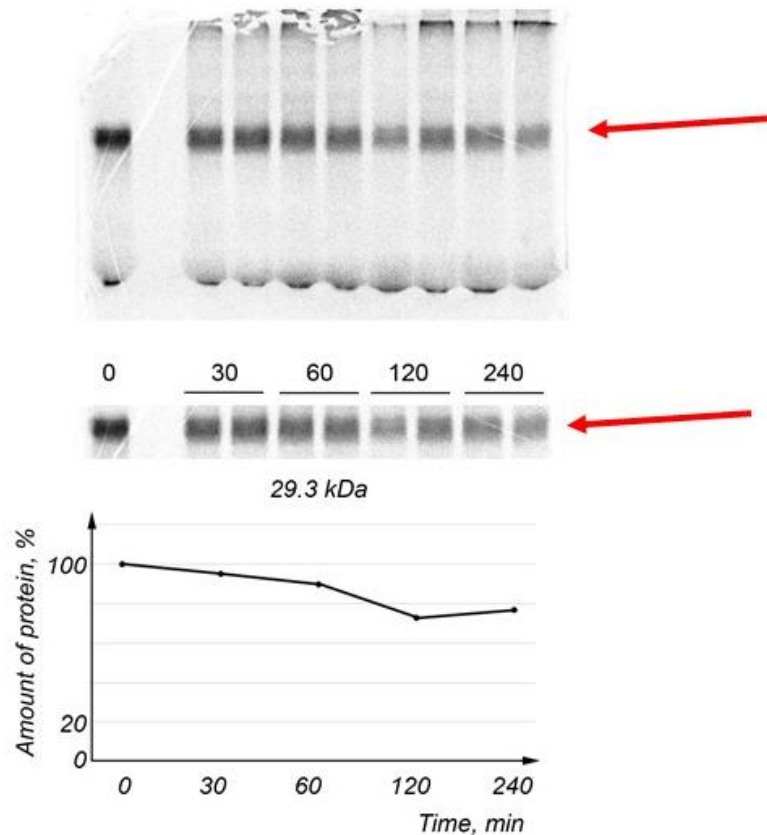


Деградація білка S18-1, отриманого за допомогою трансляції *in vitro*. Стрілкою вказано положення полоски протеїна до деградації. Наведено інвертовану версію полосок протеїна, а також обчислену кількість деградованого білка (нижня панель).



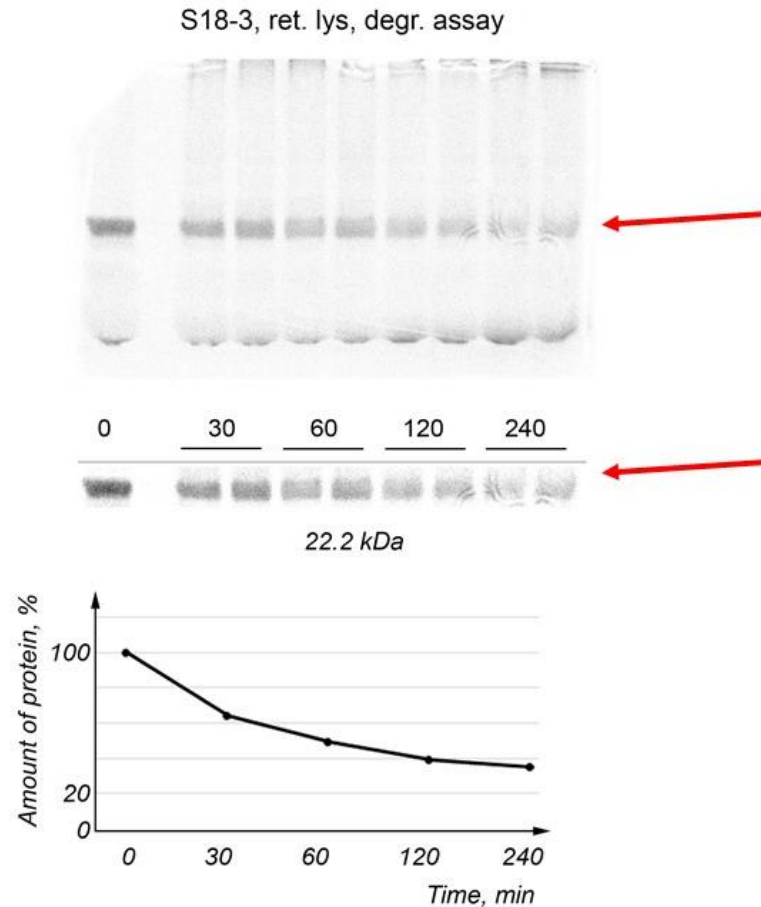
Деградація S18-2 *in vitro*

S18-2, reticulocyte lysate, degradation assay



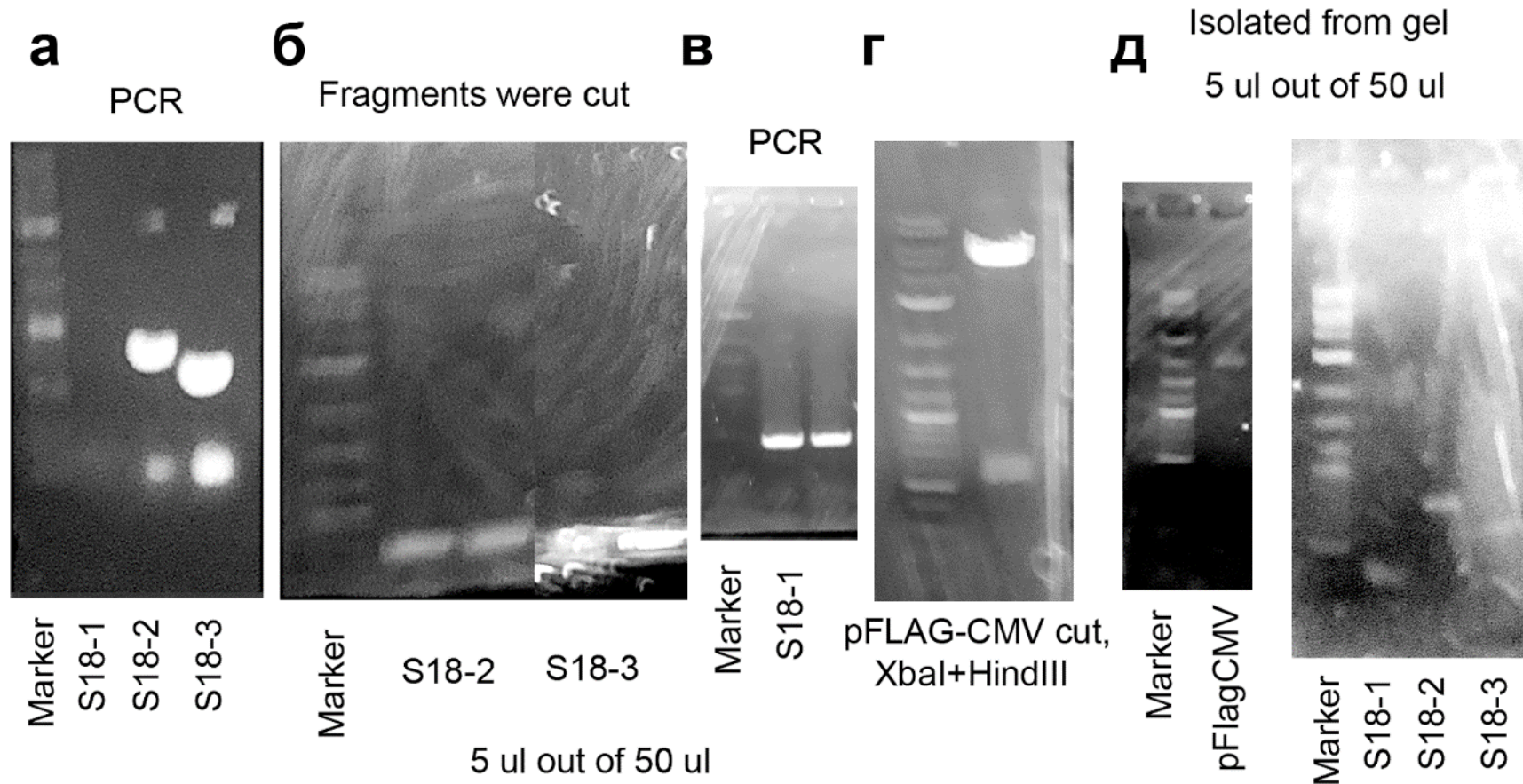
Деградація білка S18-2, отриманого за допомогою трансляції *in vitro*. Стрілкою вказано положення полоски протеїна до деградації. Наведено інвертовану версію полосок протеїна, а також обчислену кількість деградованого білка (нижня панель).

Деградація S18-3 *in vitro*

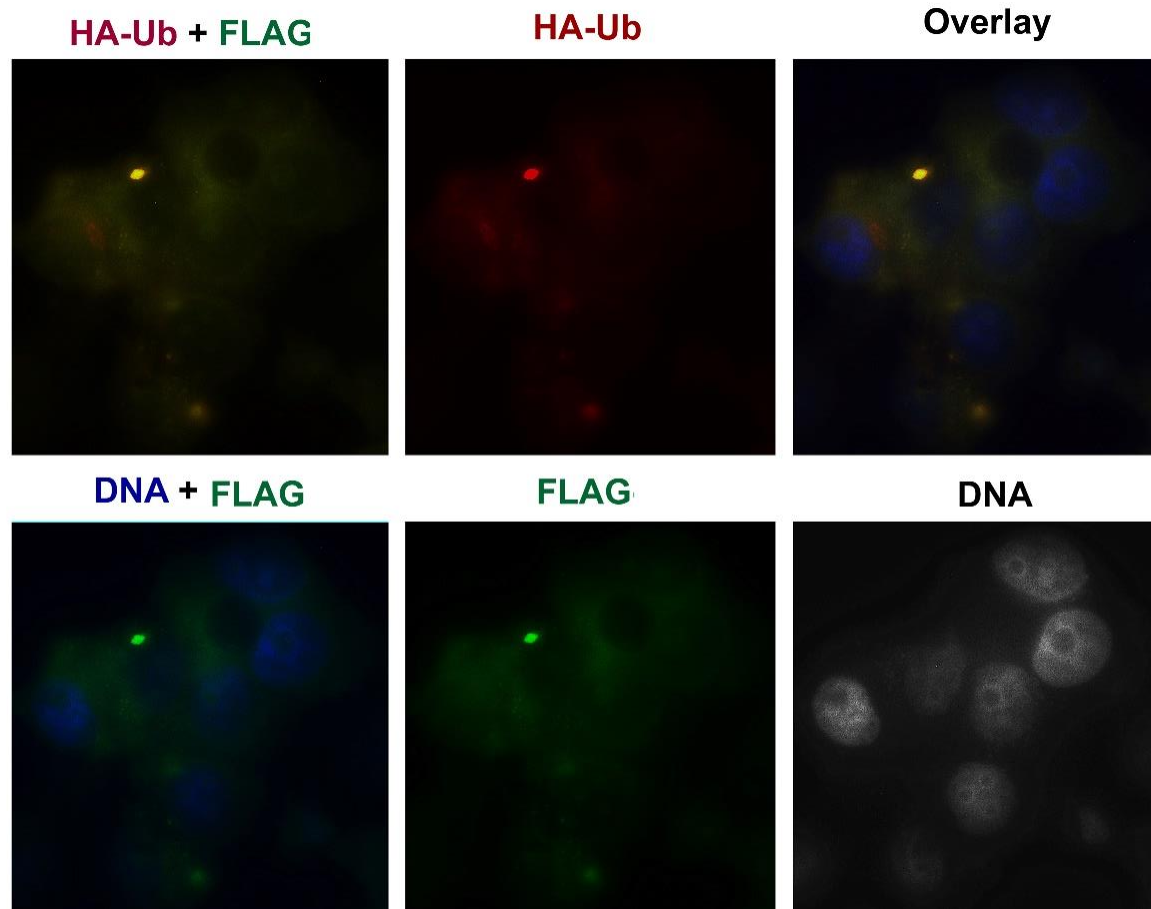


Деградація білка S18-3, отриманого за допомогою трансляції *in vitro*. Стрілкою вказано положення полоски протеїна до деградації. Наведено інвертовану версію полосок протеїна, а також обчислену кількість деградованого білка (нижня панель).

Клонування кДНК у вектор, що містить послідовність FLAG

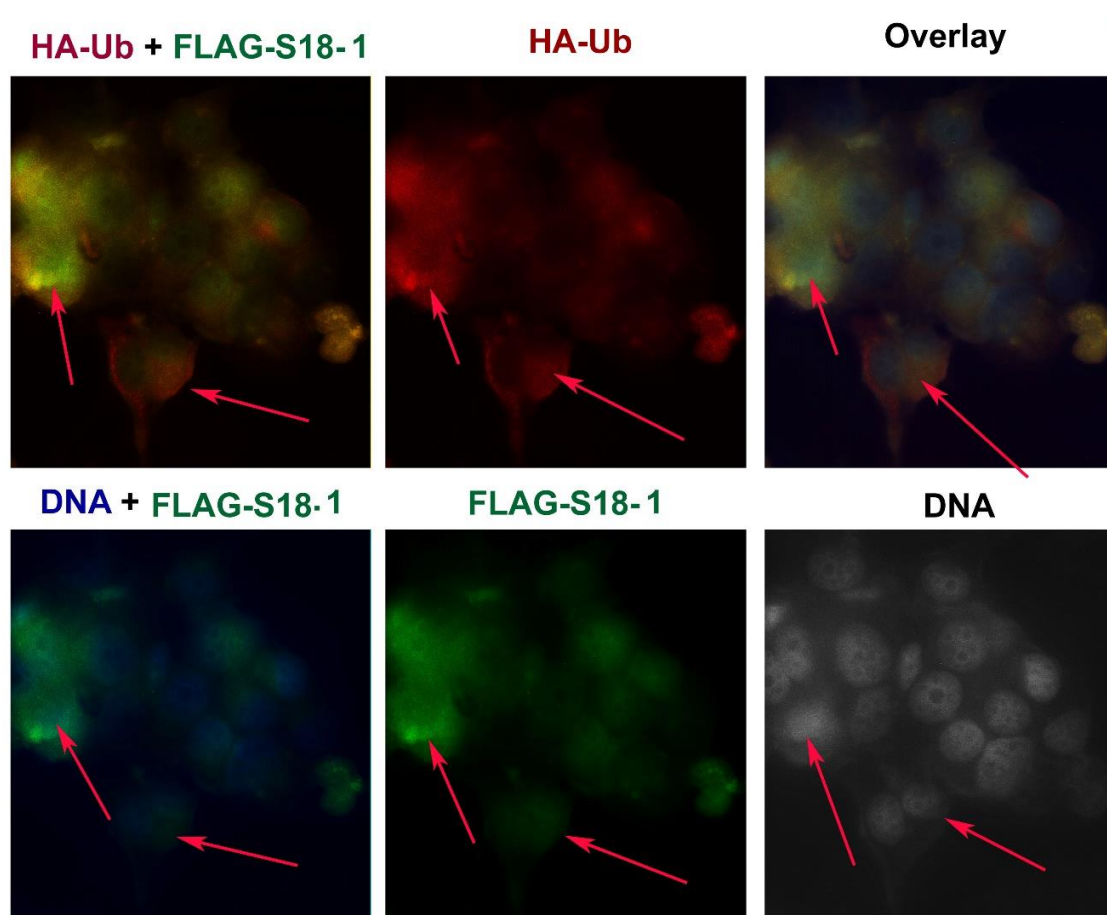


Вивчення убіквітинування у клітинах MCF7 за допомогою флуоресцентної мікроскопії



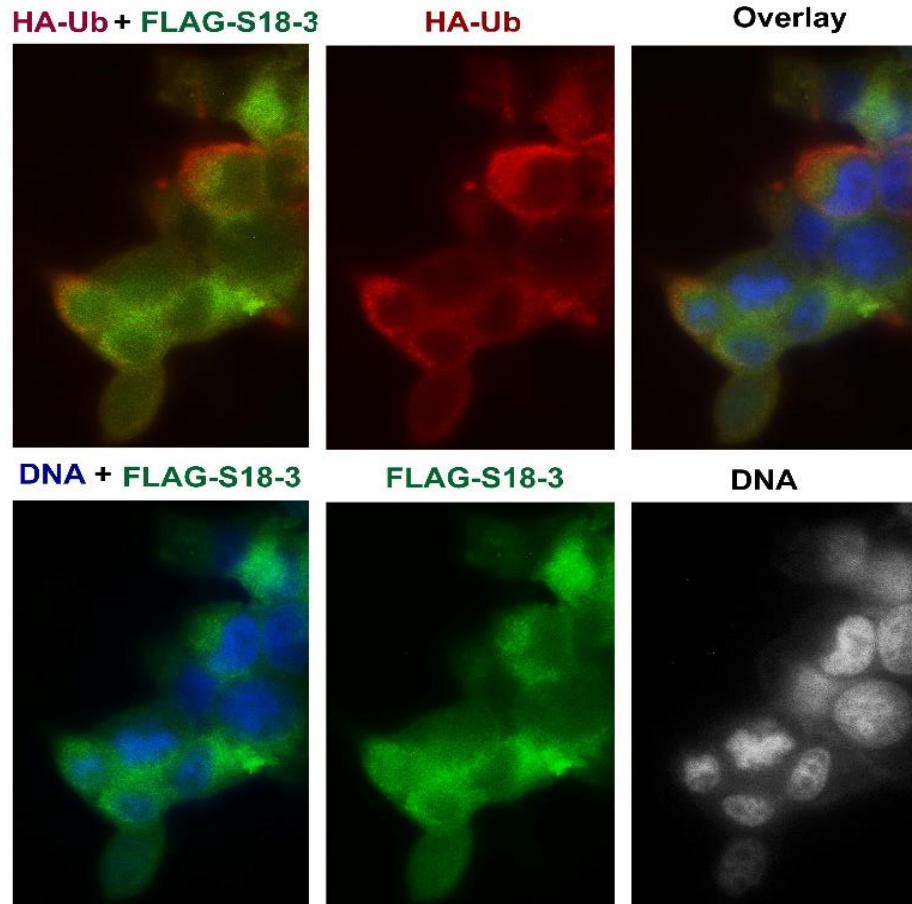
Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами pFLAG-CMV і HA-Ub.

Вивчення убіквітинування S18-1 у клітинах MCF7 за допомогою флуоресцентної мікроскопії



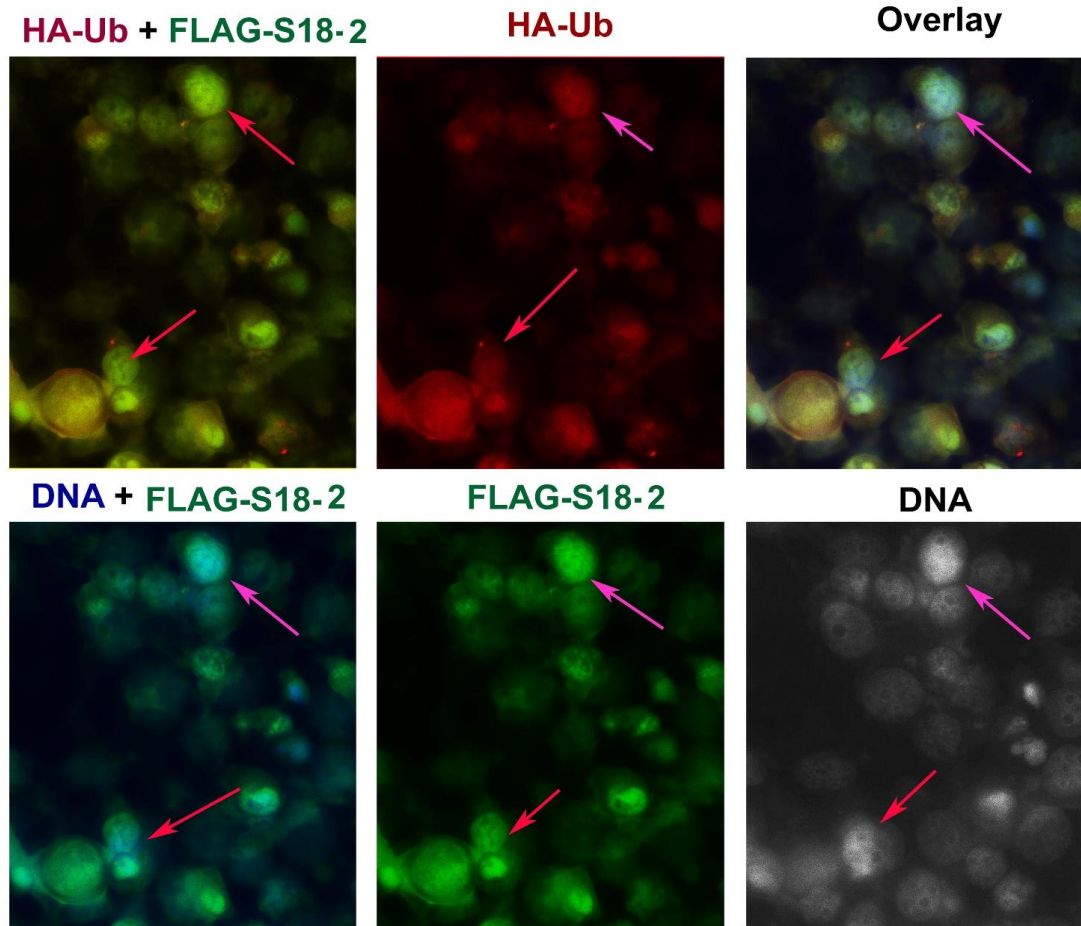
Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами pFLAG-S18-1 і HA-Ub

Вивчення убіквітинування S18-3 у клітинах MCF7 за допомогою флуоресцентної мікроскопії



Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами pFLAG-S18-3 і HA-Ub.

Вивчення убіквітинування S18-2 у клітинах MCF7 за допомогою флуоресцентної мікроскопії



Ко-трансфекція клітин MCF7 плазмідами pFLAG-S18-2 і HA-Ub

Висновки

1. Проведено кон'югацію убіквітина із протеїнами родини MRPS18 (1-3) і вивчено кінетику їх протеасомної деградації *in vitro* та *in vivo* (у культурах клітин).
2. Показано, що всі протеїни родини MRPS18 мають різний період напіврозпаду. Самим нестабільним є протеїн MRPS18-3, що деградується за декілька хвилин, в той час як протеїн MRPS18-2 практично не руйнується.
3. Беручи до уваги роль MRPS18-2 у підтримці моно-убіквітування гістона H2B, а також отримані дані по стабільності білків, можна передбачити важливу функцію MRPS18-2 у підтримці конфігурації еухроматину, що дозволяє активну експресію ряду генів, контролюючих проліферацію клітини.