

Влияние провоспалительной стимуляции на деградацию СОХ-2 в астроглиальных клетках

Выполнил ученик 10 класса (СУНЦ МГУ)

Обрящиков Иван

Научный руководитель: к.б.н. м.н.с. НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского
Астахова Алина Анатольевна

Москва 2018 г.



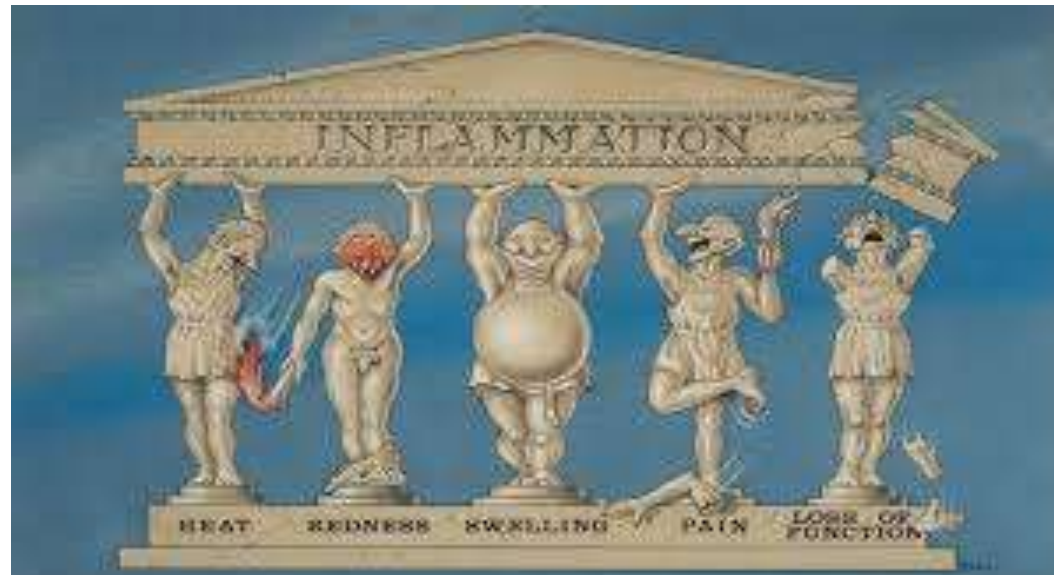
Введение

Актуальность: изучение механизмов регуляции воспалительного ответа. Показано, что регуляция на уровне стабильности мРНК или белка может иметь существенное значение в условиях воспалительного ответа.

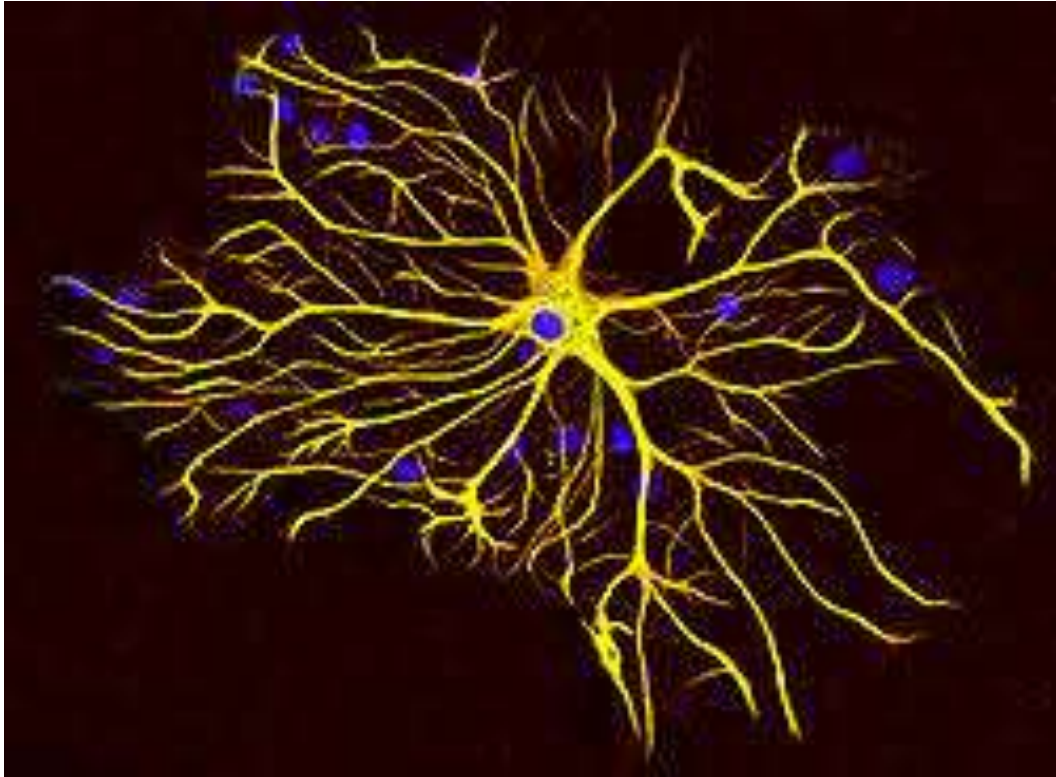
Новизна: влияние воспалительных условий на изменение скорости деградации белка СОХ-2 в астроглиальных клетках ранее исследовано не было.

Воспаление

Термин воспаление ввёл Цельс (ок. 25 до н. э. — ок. 50 н. э.) — древнеримский учёный-энциклопедист, он же и дал пять основных признаков воспаления: Dolor – боль, Rubor – покраснение, Calor – температура (повышенная), Tumor – опухание, Functia laesa – понижение работоспособности. Все выше перечисленные симптомы воспаления обуславливаются белками, которые синтезируются в клетках. Одним из важнейших белков воспаления является COX2.



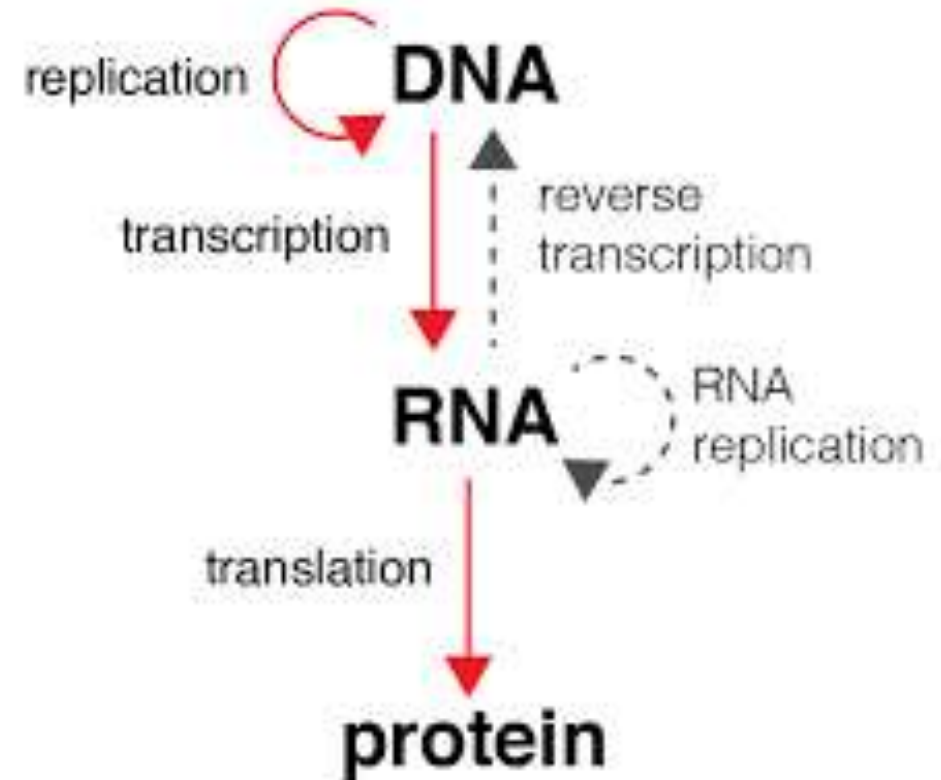
Астроциты



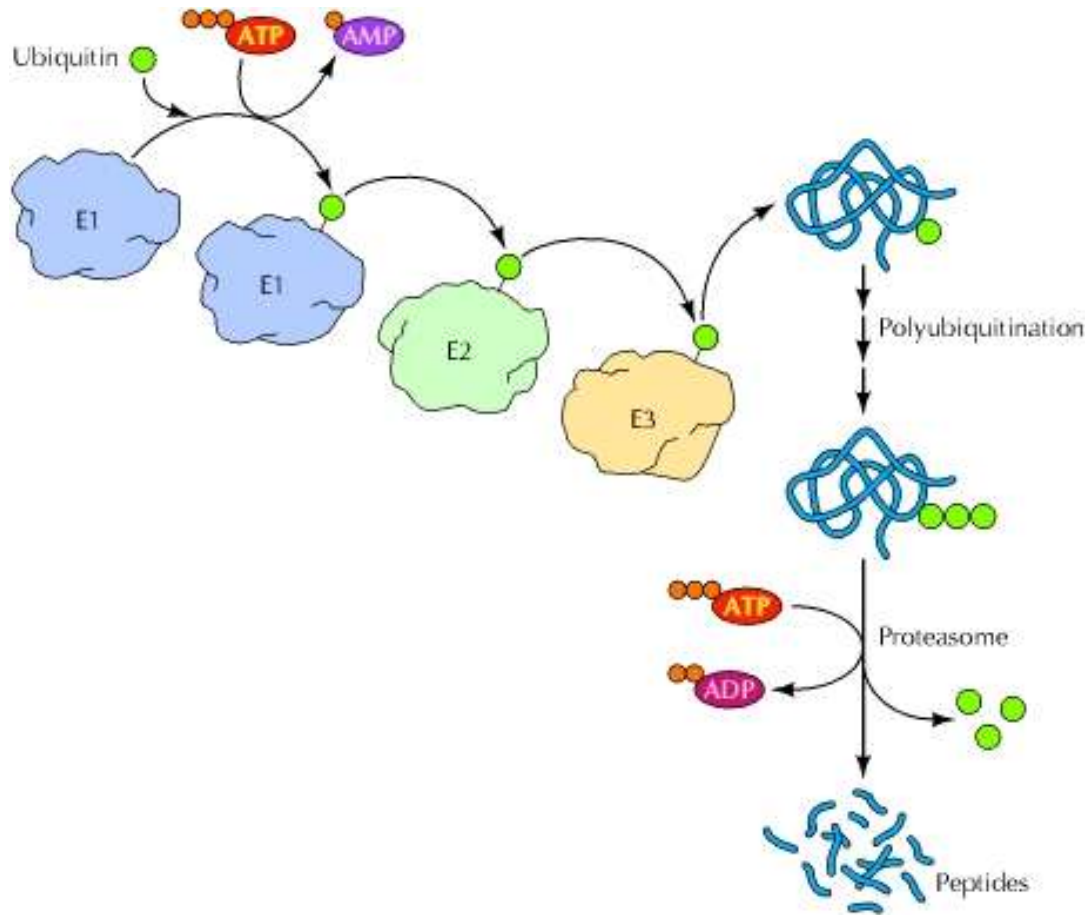
Астроциты - глиальные клетки мозга, играющие важную роль в поддержании жизни нейронов, они образуют гематоэнцефалический барьер. Ранее считалось, что астроциты имеют лишь функцию поддержки, однако сейчас показано, что у них множество различных функций, вплоть до регуляции проведения сигналов в синаптических контактах.

Уровни регуляции экспрессии генов

1. Транскрипционная
2. Посттранскрипционная
3. Трансляционная
4. Посттрансляционная

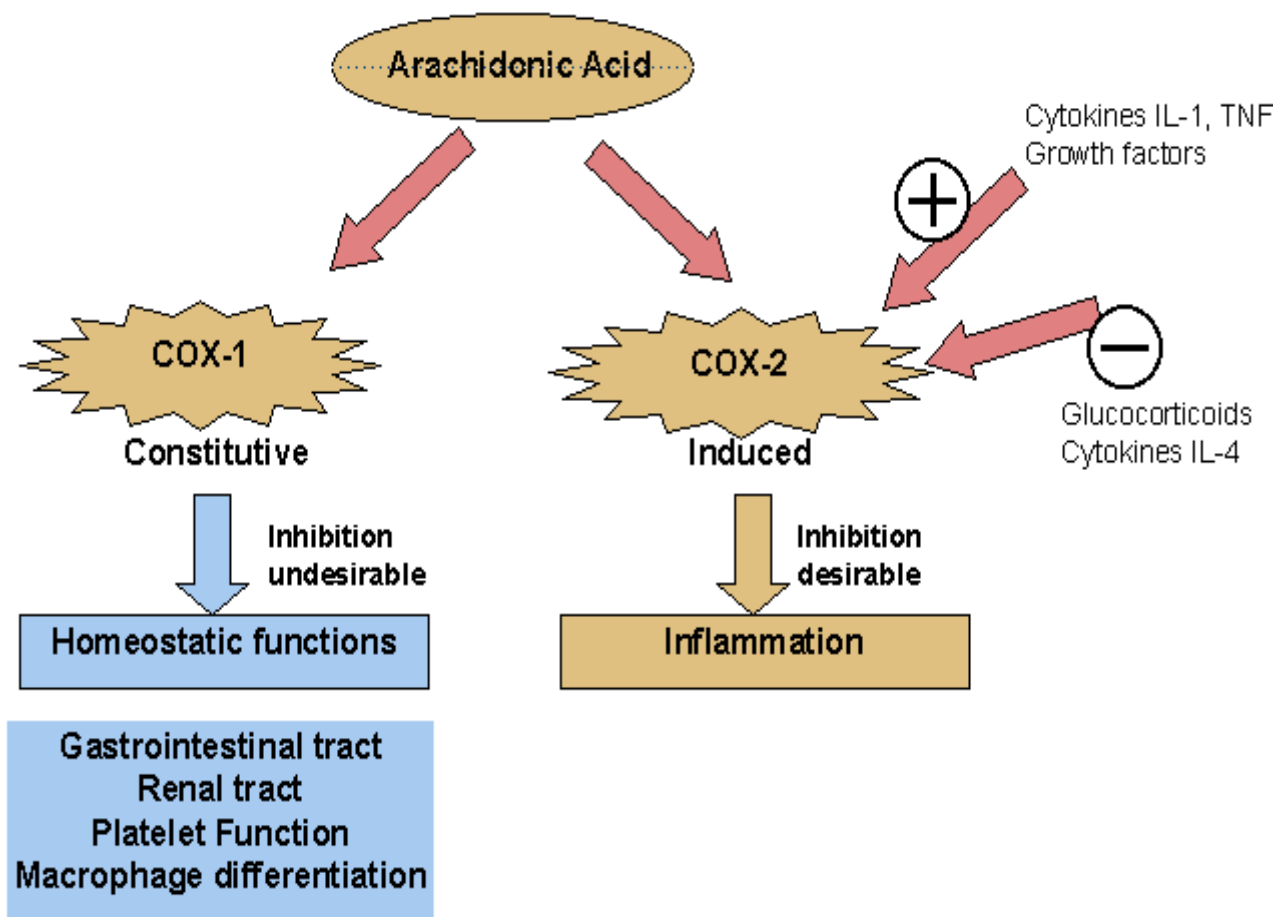


Деградация



Деградация – процесс уничтожения молекул, которые выполнили свою функцию и на данном этапе жизни клетки больше не нужны. В эукариотических клетках два основных пути деградации белков - убиквитин-зависимая протеросомная деградация и лизосомальный протеолиз.

COX-2



Ферменты циклооксигеназы, COX-1 и COX-2 (циклооксигеназа-2), катализируют образование простагландинов, тромбоксанов.

Цели и задачи

Цель – определить влияние условий воспаления на скорость деградации циклооксигеназы 2 в астроглиальных клетках

Задачи:

1. Оценить скорость деградации СОХ-2 в клетках, не подвергнутых воспалительной стимуляции;
2. Проанализировать изменение скорости деградации белка СОХ-2 под воздействием провоспалительной стимуляции клеток

Ход работы

1. Получение культуры астроцитов
2. Проведение эксперимента со стимуляциями ЛПС и ЦГК:
 - А) Для 1-ой группы астроцитов (без стимуляции ЛПС)
 - 1) Взяли 5 групп клеток: без обработки ЦГК, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов.
 - 2) Сняли культуры клеток, лизировали мембрану и провели электрофорез для определения концентрации СОХ₂.
 - Б) Для 2-ой группы астроцитов (со стимуляцией ЛПС – 100нг/мл (4часа))
 - 1) Взяли 5 групп клеток: без обработки ЦГК, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов.
 - 2) Сняли культуры клеток, лизировали мембрану и провели электрофорез для определения концентрации СОХ₂.



COX-2



β-тубулин

Контроль ЛПС (4ч) ЦГК+ЛПС (4ч)

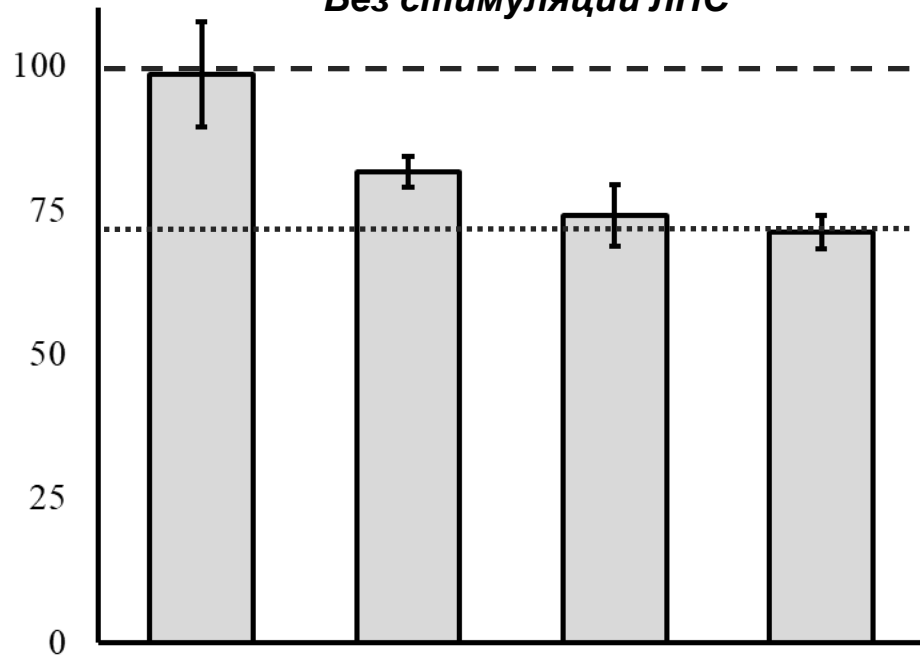
ЛПС – 100 нг/мл

ЦГК добавлен за 15 мин до ЛПС

Результаты

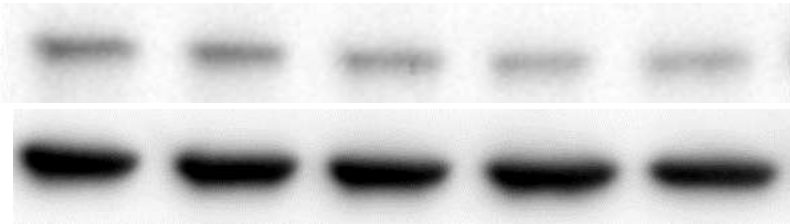
Относительное кол-во
COX2 в(%)

Без стимуляции ЛПС



1ч ЦГК 2ч ЦГК 4ч ЦГК 6ч ЦГК

Время стимуляции ЦГК



COX-2

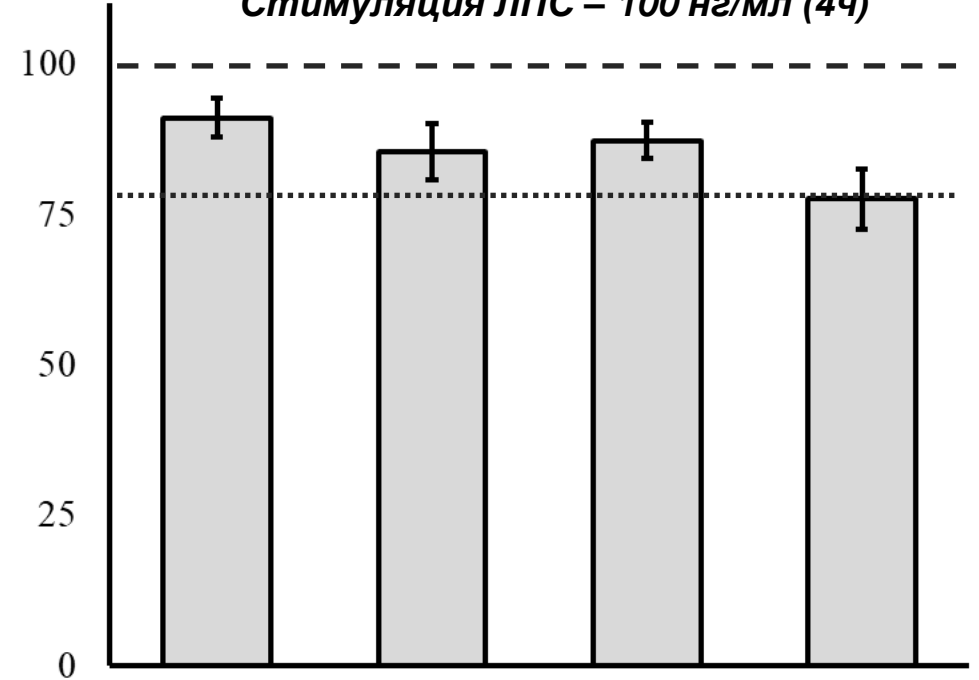
β -тубулин

Контроль ЦГК-1ч ЦГК-2ч ЦГК-4ч ЦГК-6ч

Без стимуляции ЛПС

Относительное кол-во
COX2 в(%)

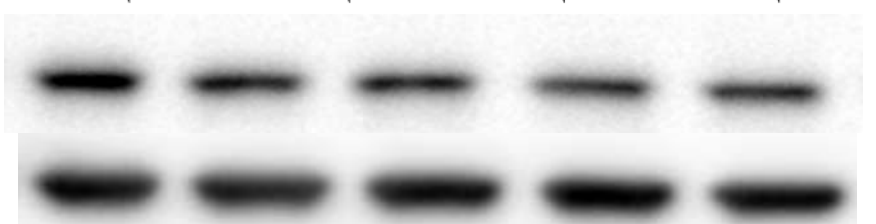
Стимуляция ЛПС – 100 нг/мл (4ч)



1ч ЦГК 2ч ЦГК 4ч ЦГК 6ч ЦГК

COX-2

β -тубулин



Контроль ЦГК-1ч ЦГК-2ч ЦГК-4ч ЦГК-6ч

Стимуляция ЛПС – 100 нг/мл (за 4ч до ЦГК)

Выводы

1. Скорость деградации белка СОХ2 без стимуляции происходит относительно линейно, этот белок можно отнести к устойчивым, так как полностью он не деградировал даже за 6 часов.
2. Скорость деградации белка СОХ2 с воспалительной стимуляцией ниже, чем без нее, и можно заметить повышение устойчивости белка, так как после 1-ого часа деградации практически не происходит.

Литература

1. Астахова Алина Анатольевна “ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ АСТРОЦИТОВ ПРИ ИХ ОДНОКРАТНОЙ И ПОВТОРНОЙ СТИМУЛЯЦИЯХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ”
2. Drogemuller K, Helmuth U, Brunn A, Sakowicz-Burkiewicz M, Gutmann DH, Mueller W, Deckert M, Schluter D (2008)
3. Чистяков Дмитрий Викторович “РЕГУЛЯЦИЯ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ PPAR α , - β , - γ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ.”
4. Sofroniew M. V. (2005)
5. De Keyser J, Mostert JP, Koch MW (2008)
6. Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (2006)
7. Neuss H, Huang X, Hetfeld B. K., Deva R, Henklein P, Nigam S, Mall J. W., Schwenk W, Dubiel W. “The ubiquitin- and proteasome-dependent degradation of COX-2 is regulated by the COP9 signalosome and differentially influenced by coxibs.”
8. Wada M, Saunders T.L., Morrow J, Milne G. L., Walker K. P., Dey S. K., Brock T. G., Opp M. R., Aronoff D. M., Smith W. L. “Two pathways for cyclooxygenase-2 protein degradation in vivo.”
9. Sofroniew M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation // Trends Neurosci. 2009.
10. Farina C., Aloisi F., Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity.
11. Sofroniew M. V., Vinters H.V., Astrocytes: biology and pathology // Acta Neuropathol. 2010. 119. P:7- 35
12. Anderson P. Intrinsic mRNA stability helps compose the inflammatory symphony. Nat. Immunol. 2009.10. P:233-234.
13. Rajakariar R., Yaqoob M.M., Gilroy D.W. COX-2 in inflammation and resolution. Mol. Interv. 2006. 6. P:187-207.
14. Chistyakov DV, Aleshin S., Sergeeva MG, Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ expression and activity levels by toll-like receptor agonists and MAP kinase inhibitors in rat astrocytes // Journal of Neurochemistry. том 130, № 4, с. 563-574
15. Uri R. Mbonye, Chong Yuan, Clair E. Harris, et. al. Two Distinct Pathways for Cyclooxygenase-2 Protein Degradation // Journal of Biological Chemistry. January 18, 2008.

Благодарности

Особую благодарность хочется выразить
Глебовне Марине Глебовне
за предоставление лаборатории.

Обрящиков Иван Евгеньевич,
oel13@mail.ru

Спасибо за внимание