

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Белок ядрышка фибрилларин как ранний сенсор окислительного стресса в клетках человека HeLa

Братцева Анна Леонидовна

Студент

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: anabellabr@mail.ru

Фибрилларин – один из наиболее эволюционно консервативных белков эукариотической клетки. Он локализуется в плотном фибриллярном компоненте ядрышек и в тельцах Кахаля. В ядрышке фибрилларин участвует в поддержании структуры [3], раннем процессинге и модификации пре-рРНК [2]. У млекопитающих фибрилларин относится к числу наиболее подвижных белков ядра [3]. Так, под действием H_2O_2 и $HgCl_2$ - индукторов окислительного стресса, белок изменяет локализацию [1, 2]. Однако вопрос о том, насколько быстро при окислительном стрессе изменяются свойства фибрилларина, остается открытым.

В настоящей работе с помощью непрямой иммуноцитохимии, иммуноблотирования, конфокальной лазерной микроскопии и метода FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) мы исследовали поведение фибрилларина в клетках человека HeLa под действием H_2O_2 в широком диапазоне концентраций от 200 мкМ до 10мМ. В отличие от других методов анализа, метод FRAP позволяет изучать свойства белка интереса в живых клетках и оценить такие параметры как время полувосстановления флуоресценции его химер (отражающее скорость обмена в местах расположения белка), а также долю мобильной фракции белка, которая обладает функциональной активностью [4, 5].

Полученные результаты показали, что воздействие окислителя приводит к исчезновению характерных фокусов расположения фибрилларина внутри ядрышка, а затем – к появлению белка в нуклеоплазме и, наконец, в цитоплазме. При 10мМ H_2O_2 эти изменения отчетливо проявлялись через 30 мин в отдельных клетках и через 2 ч после начала обработки наблюдались во всех клетках. При этом на иммуноблотах электрофоретическая подвижность белка изменялась с ~34 кДа (в контроле) до 37-38 кДа (10мМ H_2O_2 , 2 ч).

Однако методом FRAP изменения свойств фибрилларина выявлялись уже после инкубации клеток с H_2O_2 в течение 1-9 мин. Они проявлялись в увеличении времени полувосстановления флуоресценции и уменьшении доли мобильной фракции фибрилларина-EGFP, что свидетельствует о ранней инактивации и иммобилизации белка при действии окислителя. Изменение динамических характеристик фибрилларина при минимальном времени воздействия H_2O_2 наблюдалось во всем диапазоне концентраций H_2O_2 , хотя доля «измененных» клеток была пропорциональна концентрации перекиси. Результаты работы позволяют заключить, что белок фибрилларин является ранним сенсором окислительного стресса в клетках HeLa, а метод FRAP является «чувствительным» методом анализа свойств белков ядрышка в условиях стресса.

Литература

1. Арефьева А.С. Роль ртути в процессах жизнедеятельности организма человека и млекопитающих // Экологическая химия. 2009, 18(4). 189–201.
2. Барыкина Н. В. Реакция ядрышка и его основных белков на окислительный стресс в клетках человека. Дипломная работа. Москва, 2009.
3. Chen, M. Specific inhibition of rRNA transcription and dynamic relocation of fibrillarin induced by mercury // Experimental Cell Research. 2000, 259. p. 225-238.
4. Phair, R.D. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus // Nature. 2000, 404. p.604-609.
5. Snaar, S. Mutational analysis of fibrillarin and its mobility in living human cells // The Journal of Cell Biology. 2000, 151. p.653-662.