

УДК 57.034:577.217.5+57.085.23

## БЛОКИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕАСОМ НАРУШАЕТ РИТМ СИНТЕЗА БЕЛКА – МАРКЕРА ПРЯМЫХ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

© 2015 г. В. Я. Бродский, Н. П. Шарова, Л. А. Мальченко, Д. С. Конченко\*, Т. К. Дубовая\*, Н. Д. Звездина

Институт биологии развития РАН им. Н.К. Кольцова  
119334, Москва, ул. Вавилова 26

\* Российский национальный исследовательский медицинский университет  
117997, Москва, ул. Островитянова 1  
E-mail: brodsky.idb@bk.ru

Поступила в редакцию 18.07.2014 г.  
Окончательный вариант получен 21.08.2014 г.

Исследовано влияние торможения активности протеасом на прямые межклеточные взаимодействия в первичных культурах гепатоцитов. Маркер межклеточных коммуникаций – околочасовой ритм синтеза белка. Введение ингибитора протеасом MG132 в дозах 10 или 20 мкМ в среду с культурами гепатоцитов на 19 час приводит к значительному снижению суммарного пула <sup>3</sup>H-лейцина в клетках. Включение лейцина в белки изменяется мало или не изменяется, падает содержание свободного меченого лейцина в гепатоцитах. Искажается сравнительно с контролем ритм синтеза белка. Ритм восстанавливается внешними организаторами – ганглиозидами и мелатонином, а также при усилении активности протеинкиназ – ключевого фактора организации ритма синтеза белка. Кратковременное 3-ч действие MG132 не изменяет пул лейцина, но ритм синтеза белка также нарушается. Таким образом, катаболизм белков влияет на межклеточные взаимодействия, организующие ритм синтеза белка. Другой фактор негативного контроля ритма синтеза белка – секреция белков из гепатоцитов, показанная *in vivo* во многих исследованиях, выявлена и в нашей работе при измерениях белков, окрашенных кумасси бриллиантовым синим G250 в среде с культурами гепатоцитов.

**Ключевые слова:** межклеточные взаимодействия, протеасомы, ингибитор MG132, околочасовые ритмы, ритм синтеза белка, секреция белков, гепатоциты, кумасси G250.

DOI: 10.7868/S047514501501005X

### ВВЕДЕНИЕ

Ритм синтеза белка – один из метаболических околочасовых ритмов (Бродский, 2014). Такие ритмы в клеточных культурах организуются прямыми межклеточными взаимодействиями, и поэтому околочасовой ритм синтеза белка используют как модель для изучения механизмов согласования активности клеток в онтогенезе и при патологии (см. также Brodsky, 2006). Характеризуя такую модель, уместно ответить на вопрос: почему непрерывный синтез белка с регулярным усилением накопления новообразованных белков не приводит к увеличению массы клеток? Как компенсируется синтез? Задачей настоящей работы явилось исследование способов удаления белков из клеток, по сути, негативного контроля ритма синтеза белка. Значимость модели обусловлена тем, что сходный механизм межклеточных коммуникаций определен и в клетках *in vivo*.

Основной объект наших исследований – гепатоциты – секретируют *in vivo* белки плазмы крови. В давней работе нашей лаборатории выявлены неравномерные изменения меченых лейцином новообразованных белков в культурах гепатоцитов крысы (Новикова и др., 1982). Продолжительность наблюдений была не более часа, неясны были изменения массы клеток. Настоящая работа дополняет эти исследования определением кинетики содержания белков в среде с культурами гепатоцитов, т.е. кинетики секреции. Впервые изучена возможность влияний катаболизма белков на ритм их синтеза, т.е. на межклеточные взаимодействия. Исследовали эффекты торможения активности протеасом. Ингибитор протеасом MG132 (z-leucyl-leucyl-leucynal) ранее использовали во многих работах как эффективный блокатор делений и стимулятор апоптоза в линиях трансформированных клеток (например, Ciechanover, 2010; Cusimano et al., 2010; Bra-

vo-Cuellar et al., 2013). Изучали действие MG132 на опухолевые клетки в организме или в первичных культурах как потенциального противоракового средства (Kadlčíková et al., 2004; Wente et al., 2005; Alexandrova et al., 2008). При введении MG132 в организм не учитывали возможные влияния ингибитора протеасом на нормальные интенсивно пролиферирующие ткани организма, например на костный мозг или эпителий кишечника. Не исследованы эффекты ингибирования активности протеасом на слабо делящиеся клетки, такие как гепатоциты, во многом определяющие жизнеспособность организма. Опубликованы лишь данные по формированию пула протеасом в онтогенезе печени (Шарова и др., 2006; Sharova et al., et al., 2009; Карпова и др., 2013). Влияния MG132 на метаболизм клеток и, в частности, на синтез белка, практически не изучены.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Гепатоциты изолировали** из печени крыс Вистар весом около 300 г в возрасте 3–4 мес. Печень крысы перфузировали бескальциевым раствором Хенкса с 0.5 мМ EGTA и 0.05% раствором коллагеназы (Sigma, США) в среде 199, и получали суспензию гепатоцитов, содержащих около 90% жизнеспособных клеток. Суспензию разводили средой до концентрации около  $10^6$  клеток/мл и разливали в чашки Петри, на дне которых были стекла, покрытые коллагеном, и получали плотные культуры с близко расположенными клетками. Через 2 часа стекла с прикрепившимися клетками отмывали от неприкрепленных клеток и клеточных обломков и помещали в свежую среду 199, к которой были добавлены 0.2 мг/мл альбумина для клеточных культур (Sigma) и 0.5 мкг/мл инсулина (Sigma); газовая фаза – 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>. Через сутки культуры промывали, переносили в свежую среду и исследовали кинетику синтеза белка. Подробнее метод изоляции и культивирования гепатоцитов изложен ранее (Brodsky et al., 2000).

**Интенсивность синтеза белка** определяли по включению <sup>3</sup>H-лейцина в белки с поправкой на радиоактивность пула свободного лейцина в той же культуре. Пробы, по три культуры каждая, брали последовательно через 10 мин в течение 2 час. Каждую культуру инкубировали отдельно в течение 10 мин при 37°C в среде с <sup>3</sup>H-лейцином (25–30 мкCi/мл, специфическая молярная активность 70–100 Ci/ммоль). Культуры промывали холодной средой и обрабатывали холодной (4°C) 5% хлорной кислотой в течение 50 мин. Затем культуры промывали этиловым спиртом, и клеточные белки растворяли гиамином (бензетониум гидроксид, Sigma). Радиоактивность лейцина в белках и небелковой кислоторастворимой фракции,

т.е. свободного лейцина в клетках измеряли в каждой культуре отдельно, используя сцинтилляционный анализатор Perkin Elmer 2810TR. Относительное включение лейцина I<sub>согг</sub>, характеризующее интенсивность синтеза белка, рассчитывали по формуле

$$I_{\text{согг}} = I_i \times P_v/P_i \text{ (срм)},$$

где I<sub>i</sub> – включение лейцина в белки за 10 мин, P<sub>i</sub> – общая радиоактивность определенной культуры P<sub>i</sub> = I<sub>i</sub> + p<sub>i</sub>, где p<sub>i</sub> – радиоактивность пула свободного лейцина в той же культуре, а P<sub>v</sub> – средняя радиоактивность культур определенного опыта (например, для 2-час опыта – 36 культур). Поскольку включение лейцина в белки и пул свободного лейцина измеряются в одной и той же культуре, в относительной величине I<sub>согг</sub> вводится поправка на варьирующее число клеток в разных культурах. Как показали наши наблюдения, компенсируются также небольшие вариации температуры и рН среды в течение опыта (Brodsky et al., 2000). Каждый опыт ставили на культурах гепатоцитов одной крысы.

Для оценки **значимости протеасом** в организации ритма синтеза белка использовали ингибитор протеасом MG132 в дозах 10 или 20 мкМ (таблица). В среду с первичными плотными культурами гепатоцитов крысы после их прикрепления к стеклам, покрытым коллагеном, добавляли MG132 на 3 или на 19 час. Затем культуры отмывали, исследовали кинетику включения <sup>3</sup>H-лейцина в белки суточных культур, а также пул свободного (не включившегося в белки) лейцина и рассчитывали относительное включение I<sub>согг</sub>, т.е. относительную скорость синтеза белка.

В исследовании кинетики **секреции** белков использовали суточные культуры гепатоцитов. Культуры отмывали и помещали в среду 199 без индикатора (фенолового красного) и без альбумина, но с инсулином (см. выше). Общий объем среды в чашке с культурами 50 мл. Объем каждой пробы – 125 мкл. Пробы брали через 10 мин в течение 2–3 час. Белки, выделенные гепатоцитами в среду, окрашивали кумасси бриллиантовым синим G250 (Bradford, 1976; Иванов, 1982). Для построения калибровочной кривой использовали от 1 до 10 мкг/мл альбумина в лунке стандартного планшета. В некоторые лунки добавляли 125 мкл чистой среды; эти точки принимали за 0. В последующие лунки добавляли альбумин, растворенный в культуральной среде. В каждую лунку со стандартом или секреторным продуктом добавляли 125 мкл реактива Бредфорда. Оптическую плотность окраски измеряли на фотометре Beckman Coulter DTX 880 в области спектра 595 нм. Для расчета дифференциальных изменений интенсивности секреции в соседних парах проб вычитали из численного значения каждой последующей пробы значение предыдущей пробы.

Влияние ингибитора протеасом MG132 на включение  $^3\text{H}$ -лейцина в белки плотных суточных культур гепатоцитов крысы (I), пул свободного меченого лейцина в тех же культурах (P) и относительное включение (Icorr), характеризующее интенсивность синтеза белка

Номер	MG132 час	Вариант	I	P	I + P	P/I	Icorr
1	3	Контроль	54	592	646	11.0	69 ± 5
		MG132 10 мкМ	51	479	530	9.4	62 ± 3
2		Контроль	309	462	771	1.5	305 ± 12
		MG132 10 мкМ	286	465	751	1.6	292 ± 10
3	19	Контроль	152	645	797	4.0	206 ± 15
		MG132 10 мкМ	151	267	418	1.8	175 ± 17
		MG132 20 мкМ	149	271	420	1.8	183 ± 17
4		Контроль	159	862	1021	5.4	225 ± 22
		MG132 10 мкМ	142	284	426	2.0	211 ± 17
		DMSO 2%	156	947	1102	6.1	186 ± 15
5		Контроль	234	1546	1780	6.6	200 ± 27
		MG132 10 мкМ +	177	417	594	2.3	236 ± 17
		+ BBG 0.3 мкМ	204	571	775	2.8	249 ± 23
6		Контроль	296	4012	4308	13.5	308 ± 50
		MG132 10 мкМ	337	116	453	0.3	333 ± 4
7		Контроль	121	1333	1454	11.0	165 ± 19
		MG132 10 мкМ	99	86	185	0.9	101 ± 3
		Мелатонин 5 нМ	111	74	185	0.7	112 ± 4
8		Контроль	189	4414	4603	23.3	206 ± 12
		MG132 10 мкМ	229	238	467	1.0	230 ± 18
		Мелатонин 50нм	206	190	396	0.9	210 ± 6
9		Контроль	161	1763	1924	10.9	209 ± 21
		MG132 10 мкМ +	128	78	206	0.6	126 ± 2
		+ ФМА 1 мкМ	109	67	176	0.6	105 ± 3

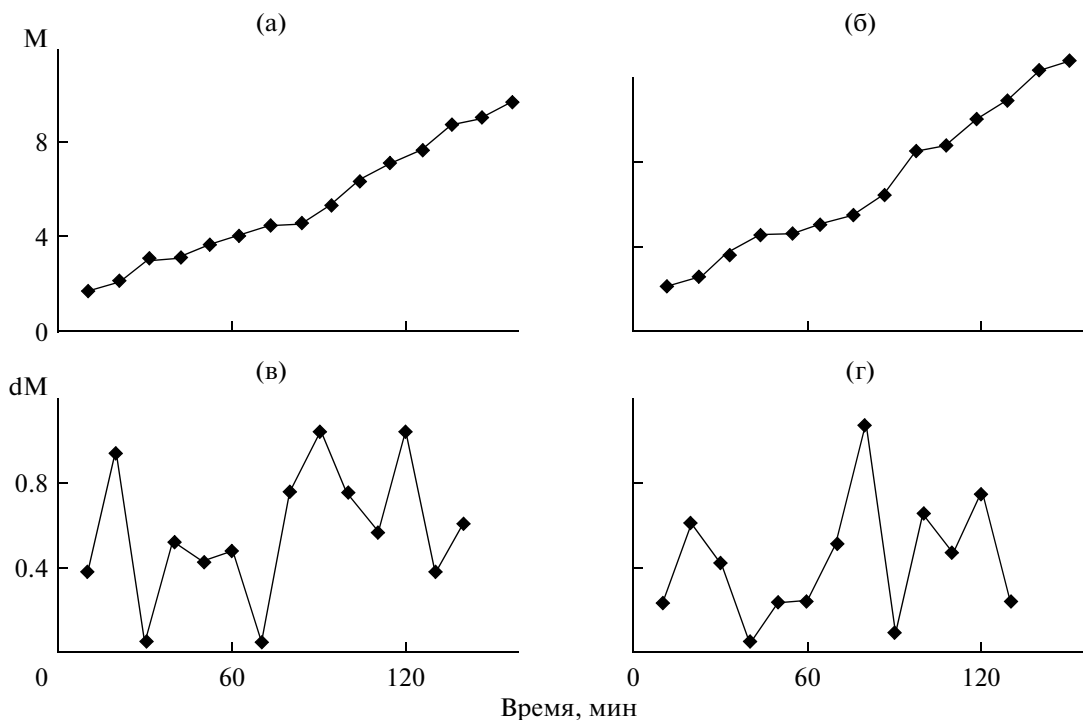
BBG (стандартный препарат суммарных ганглиозидов из мозга быка) и ФМА (форбол миристинат ацетат) вводили в среду отмытых суточных культур после 19-час действия MG132. Мелатонин вводили в среду 3-ч культур и затем в среду отмытых суточных культур. DMSO – растворитель MG132.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В среде с культурами гепатоцитов обнаружено накопление белков. Измерения проводили с 10 мин интервалами. В течение 2–3 час интенсивность окраски белков кумасси G250 в стандартных пробах 125 мкл увеличивалась в 3–5 раз (например, рис. 1). Эти наблюдения показывают выделение белков из культивируемых гепатоцитов. Дифференцирование значений, когда из рассчитанной (по калибровочной кривой) концентрации белков в пробе вычитали значение предыдущей пробы, показало неравномерность секреции белков. Определены окологосовые колебания. Следовательно, постоянное производство белка в гепатоцитах с регулярными усилениями синтеза не приводит к увеличению массы клеток уже вследствие секреции белков.

Кроме секреции, ритм определяется и частичным распадом белков. В таблице суммирован полученный материал по влиянию торможения активности протеасом на параметры включения лейцина в клетки. Индивидуальные различия абсолютных значений у разных крыс для целей нашей работы несущественны: мы сравнивали кинетику и средние параметры синтеза белка в клетках печени одной и той же крысы. Ритм в любом случае является маркером межклеточной кооперации: есть ритм – клетки взаимодействуют, нет ритма – нет кооперации. У одной крысы сравнимы и параметры синтеза белка до и после разных воздействий.

Известно, что ингибирование активности протеасом зависит не столько от дозы MG132, сколько от продолжительности его действия на клетки.



**Рис. 1.** Пример исследования накопления белков в среде с культурами гепатоцитов крысы. Белки окрашены кумасси бриллиантовым синим G250. Пробы брали каждые 10 мин в течение 2.5 час. Объем пробы 125 мкл, объем среды в чашке с культурами 50 мл. Среда без индикатора pH фенолового красного и без альбумина: (а) — после взятия пробы в среду доливали такой же объем чистой среды в чашке с культурами; (б) — пробы брали, не восстанавливая объем среды; (в) и (г) — соответствующие дифференциальные данные. По оси абсцисс — время (мин); по оси ординат: М — измеренное содержание белка в пробе (мкг/мл) и dM — разность значений М в последующей и предыдущей пробах.

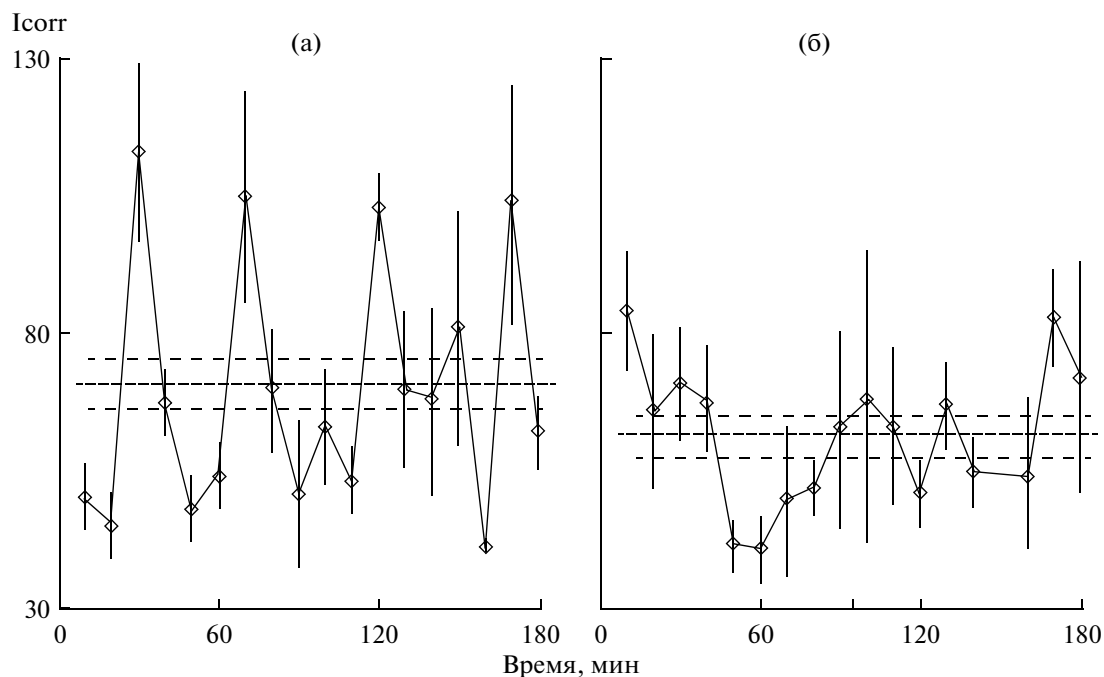
Так, в течение 1–4 час MG132 в дозах 1–20 мкМ тормозит распад лишь единичных белков в клеточных культурах; действие ингибитора на клетки в этом случае обратимо (Cowan, Murley, 2004; Dueber et al., 2011). В тех же дозах при действии в течение примерно суток ингибирование протеасом тормозит деления, и во многих клетках включается механизм апоптоза (Chen et al., 2010; Han et al., 2010; Cusimano et al., 2010). Исследование влияния торможения активности протеасом на кинетику синтеза белка в первичных культурах нормальных клеток ранее не проводили. В единичных исследованиях трансформированных клеток отмечено лишь некоторое снижение средней интенсивности трансляции (Cowan and Morley, 2004; Kadlčíková et al., 2004).

По данным таблицы, после 3 час действия 10 мкМ MG132 существенно не изменяются (сравнительно с контролем) ни включение <sup>3</sup>H-лейцина в белки плотных культур гепатоцитов, ни пул не включившегося свободного лейцина в клетках этих культур. Соответственно, не изменяется отношение пула к включению, составляя у одной крысы примерно 10. У другой крысы это отношение было низким — всего 1.5, но одинаковым в

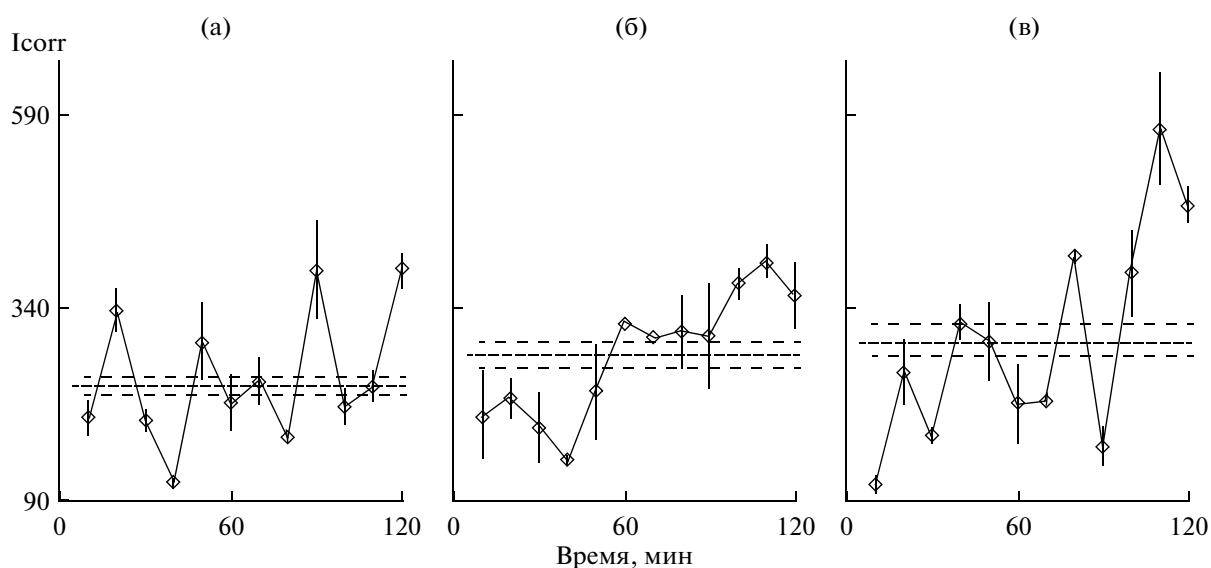
контроле и в культурах, испытывавших действие MG132.

Колебательная кинетика интенсивности синтеза белка после частичного ингибирования протеасом была выражена слабее, чем в контроле, из-за низкой синхронности некоторых культур (рис. 2; параметры синтеза белка в таблице, вариант 1). Однако, точки 10 и 20 мин высоко достоверно отличаются от точек 50 и 60 мин, а последние от 130 мин и 170 мин. Средние значения Icoг достоверно не отличались.

После 19-час действия MG132 суммарная радиоактивность лейцина — включившегося в белки и свободного — была значительно ниже после MG132, чем в контрольных культурах. Использовался проникающий лейцин во многих случаях так же, как в контроле, но не включившегося лейцина (пула) оставалось мало. Из-за низкого пула отношение пула к включению значительно снижалось. Сильнее, чем после кратковременного воздействия MG132, после 19 час изменялась кинетика синтеза белка. Введение в среду с культурами, испытывавшими 19-час действие MG132, синхронизаторов ритма синтеза белка ганглиозидов (Brodsky et al., 2000), улучшило ритм, но не восстановило пул меченого лейцина (рис. 3; таблица, вариант 5).



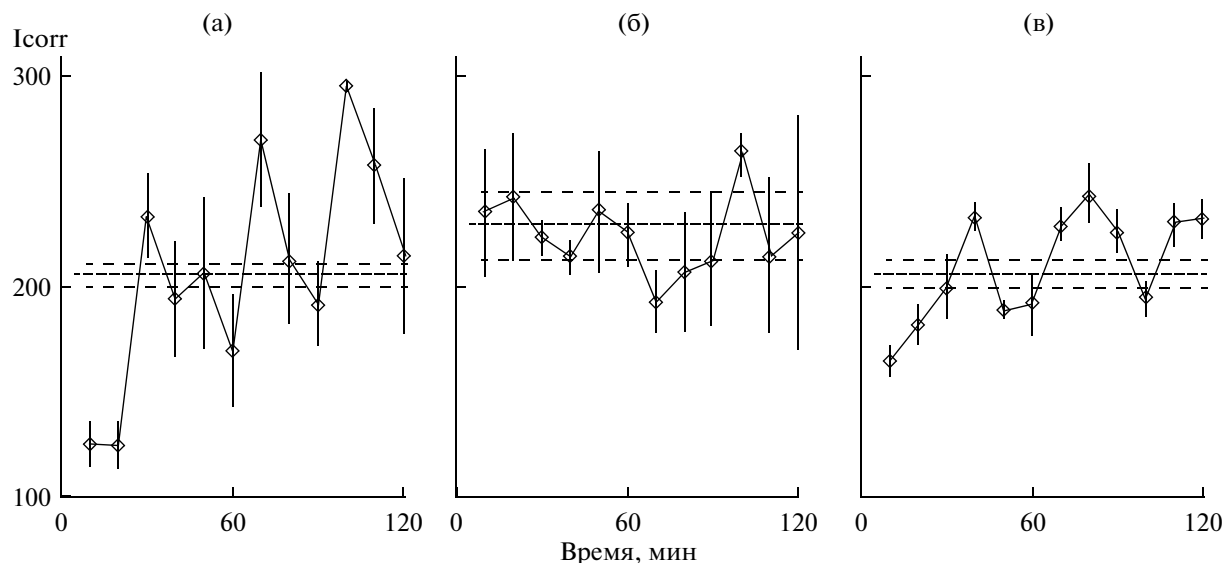
**Рис. 2.** Кинетика относительного включения  $^3\text{H}$ -лейцина в белки суточных культур гепатоцитов после ингибитора протеасом MG132: (а) — нормальные культуры; (б) — такие же отмытые культуры через 3-час действия 10 мкМ MG132. Здесь и для рис. 3–5: ось абсцисс — время (мин); ось ординат — включение лейцина относительное к пулу свободного лейцина ( $I_{\text{corr}}$ , срп).



**Рис. 3.** Кинетика относительного включения  $^3\text{H}$ -лейцина в белки суточных культур гепатоцитов после MG132 и ганглиозидов: (а) — нормальные культуры; (б) — культуры через 19 час действия 10 мкМ MG132 в среде; (в) — культуры, аналогичные (б), через 30 мин после введения в среду 0.3 мкМ ганглиозидов (стандартный препарат ганглиозидов из мозга быка — ВВГ).

Мелатонин — наиболее эффективный из изученных организатор ритма синтеза белка, действуя в наномолярных дозах — от 1 нМ (Brodsky, Zvezdina, 2011). В отличие от других изученных организаторов ритма, мелатонин проникает через

клеточную мембрану, действуя на ряд внутриклеточных процессов (Anisimov et al., 2006). В наших опытах мелатонин в двух дозах синхронизировал колебания интенсивности синтеза белка в культурах, обработанных MG132 (рис. 4; таблица, вари-



**Рис. 4.** Кинетика относительного включения  $^3\text{H}$ -лейцина в белки суточных культур гепатоцитов после MG132 и мелатонина: (а) – нормальные культуры; (б) – культуры через 19 час действия MG132; (в) – в среду с прикрепившимися к стеклу изолированными гепатоцитам ввели 50 нМ мелатонина и через 30 мин также MG132, затем через 19 час культуры отмыли и в среду ввели на 1 час 50 нМ мелатонина.

ант 8). Четкий ритм характеризует улучшение межклеточных коммуникаций. Однако транспорт лейцина в гепатоциты и, соответственно, пул свободного предшественника, не изменились. Резерв свободного лейцина после примерно суточной обработки культур MG132 оставался небольшим после действия мелатонина, также как и после ганглиозидов.

Наш материал подтвердил ранее описанный эффект температурной компенсации окологасовых ритмов, включая и ритм синтеза белка: сохранение рисунка ритма при изменениях температуры среды на несколько градусов (Lloyd, 1992; Харазова, 1999). В нескольких наших опытах температура в термостате была повышенной на 3–4°C, тем не менее, периоды ритма не отличались от обнаруженных при нормальной температуре. Эти и ряд других данных (Бродский, 2014) подтверждают представление о фрактальной природе окологасовых ритмов.

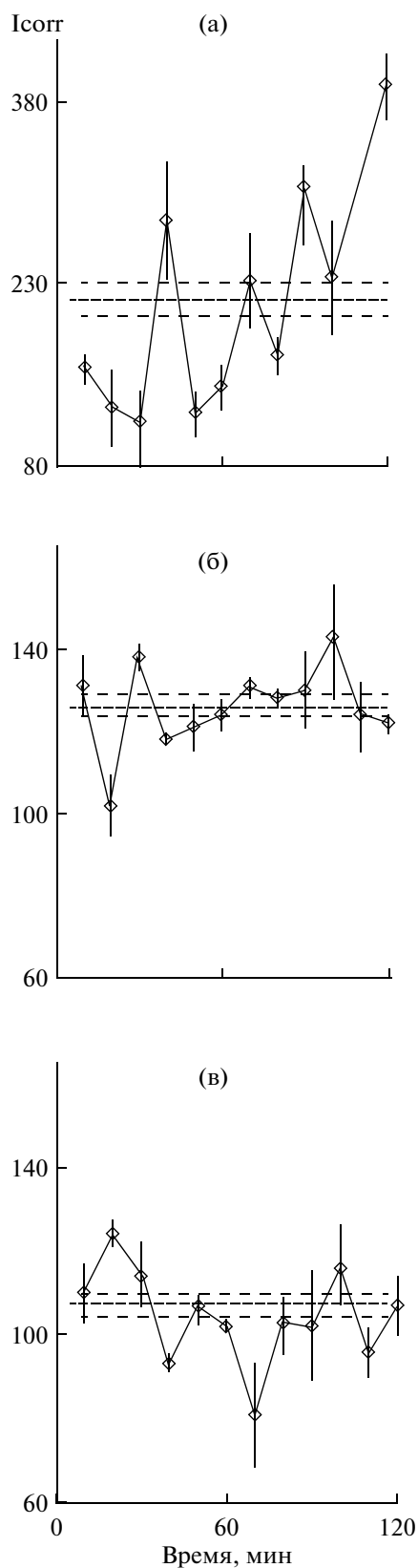
Один из известных эффектов MG132 – нарушение фосфорилирования белков (Cowan and Morley, 2004; Kadlčíková et al., 2004; Bravo-Cuellar et al., 2013).

Фосфорилирование белков – ключевой процесс организации ритма синтеза белка, исследованного нами, а также ритма активности ферментов, изученных в лаборатории Гилберта и Хэммонд (обзор – Бродский, 2014).

В опыте с усилением фосфорилирования белков форбол миристанат ацетатом (рис. 5; таблица, вариант 9) в контрольных плотных культурах гепатоцитов, как обычно, обнаружили ритм синтеза белка. Обработка таких культур 10 мкМ MG132

в течение 19 час привела к значительному, более чем в 20 раз, снижению пула свободного меченого лейцина. В кривой кинетики интенсивности синтеза белка достоверно отличались точки 10 и 20 мин, 30 и 40 мин, но рисунок колебаний отличался от четкого ритма в контроле. Форболовый эфир синхронизировал культуры и выявил четкий ритм. Но пул свободного лейцина не повысился сравнительно с ингибитором, то есть проникновение лейцина в клетки не возросло. В этом опыте, в отличие от ряда других (таблица), средний уровень синтеза белка после MG132 существенно отличался от контроля.

Таким образом, блокирование активности протеасом приводит к изменениям свойств гепатоцитов *in vitro*. Средние отношения  $I_{corr}$ , т.е. интенсивности синтеза белка после MG132 во многих случаях не отличались (таблица) и, следовательно, торможение активности протеасом затрагивает не столько трансляцию, сколько транспорт лейцина в клетку и ритм синтеза белка – маркера межклеточных взаимодействий. Внешние организаторы улучшают ритм, однако нарушение транспорта лейцина из среды в клетки при этом не восстанавливается. Катаболизм белков необходим для гепатоцитов, также как для интенсивно пролиферирующих клеток. Значение катаболизма для межклеточных коммуникаций может быть особенно велико в клетках, не секретирующих белок. Особое внимание привлекают нейроны или бластомеры, в которых выявлен ритм синтеза белка, то есть прямые межклеточные взаимодействия, а секреция белков не ясна.



**Рис. 5.** Кинетика относительного включения  $^3\text{H}$ -лейцина в белки суточных плотных культур гепатоцитов после MG132 и форболового эфира: (а) – нормальные культуры; (б) – культуры через 19 час действия MG132 в среде; (в) – культуры, аналогичные (б), через 19 час после введения в среду на 30 мин 1 мкМ форбол миририлат ацетата.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны В.С. Михайлову и А.М. Оловникову, первыми задавшими вопрос: почему клетки, регулярно усиливающие синтез белка, не увеличивают свою массу.

Благодарим Российский фонд фундаментальных исследований за поддержку (проекты 14-04-00189 и 11-04-01469).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бродский В.Я.* Околочасовые метаболические ритмы // Биохимия. 2014. Т. 79. № 6.
- Иванов В.Б.* Активные красители в биологии. М. Наука, 1982. 214 с.
- Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Астахова Т.М., Степанова А.А., Ерохов П.А., Абрамова Е.Б., Шарова Н.П.* Иммуные протеасомы в развитии иммунной системы крысы // Биоорганическая химия. 2013. Т. 39. № 4. С. 400–410.
- Новикова Т.Е., Нечаева Н.В., Фатеева В.И., Бродский В.Я.* Околочасовые колебания секреции белков из гепатоцитов в монослойной культуре // Цитология. 1982. № 1. Т. 24. С. 35–40.
- Харазова А.Д.* Цитологические основы адаптации морских моллюсков к изменениям солености. Дис. ... доктор. биол. наук. СПбУ, Петербург. 1999.
- Шарова Н.П., Астахова Т.М., Бондарева Л.А., Дмитриева С.Б., Ерохов П.А.* Особенности формирования пулов протеасом в селезенке и печени крысы в постнатальном развитии // Биохимия. 2006. Т. 71. № 9. С. 1278–1286.
- Alexandrova A., Petrov L., Georgieva A., Kirkova M., Kukan M.* Effects of proteasome inhibitor, MG132, on proteasome activity and oxidative status of rat liver // Cell Biochem. Funct. 2008. V. 26. P. 392–398.
- Anisimov V.N., Popovich I.G., Zaberzhinski M.A., Anisimov S.V., Vesnushkin G.M., Vinogradova I.A.* Melatonin as antioxidant, genoprotector and anticarcinogen // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1757. P. 573–589.
- Bravo-Cuellar A., Hernandez-Flores G., Lerma-Dhaz J., Dominguez-Rodriguez J., Jave-Surez L., Culis-Carrillo R., Aguilar-Lemarroy A., Gymez-Lomeli P., Ortiz-Lazareno P.* Pentoxifylline and the proteasome inhibitor MG132 induce apoptosis in human leukemia U937 cells through a decrease in the expression of Bcl-2 and Bcl-XL and phosphorylation of p65 // J. Biomed. Science. 2013. V. 20. P. 2–13.
- Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Brodsky V.Y.* Direct cell–cell communication. A new approach derived from recent data on the nature and self-organization of ultradian (circadian) intracellular rhythms // Biol. Reviews Cambridge Philosop. Soc. 2006. V. 82. P. 143–162.
- Brodsky V.Y., Nechaeva N.V., Zvezdina N.D., Prokazova N.V., Golovanova N.K., Novikova T.E., Gvasava I.G., Fateeva V.I.* Ganglioside-mediated synchronization of the protein synthesis activity in cultured hepatocytes // Cell Biol. Internat. 2000. V. 24. P. 211–222.
- Brodsky V.Y., Zvezdina N.D.* Melatonin as the most effective organizer of the protein synthesis rhythm in hepatocytes *in vitro* and *in vivo* // Cell Biol. Internat. 2010. V. 34. P. 199–204.
- Chen J., Mackenzie R., Cook, B.A., Scott N.P., Kunimallaiyaan M., Chen H.* MG-132 Inhibits carcinoid growth and alters the neuroendocrine phenotype // J. Surg. Res. 2010. V. 158. P. 15–19.
- Ciechanover A.* Intracellular protein degradation: from a vague idea through the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting // Medicina (B. Aires). 2010. V. 70. № 2. P. 105–119.
- Cowan J.L., Morley S.J.* The proteasome inhibitor, MG132, promotes the reprogramming of translation in C2C12 myoblasts and facilitates the association of hsp25 with the eIF4F complex. Europ // J. Biochem. 2004. V. 271. P. 3596–3611.
- Cusimano A., Azzolina A., Iovanna J.L., Bachvarov D., McCubrey J.A., D'Alessandro N., Montalto G., Cervello M.* Novel combination of celecoxib and proteasome inhibitor MG132 provides synergistic antiproliferative and proapoptotic effects in human liver tumor cells // Cell Cycle. 2010. V. 9. P. 1399–13410.
- Dueber E., Schoeffler A., Lingel A., Elliott J., Fedorova A., Giannetti A.* Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination // Science. 2011. V. 334. P. 376–380.
- Goldbaum O., Vollmer G., Richter-Landsberg C.* Proteasome inhibition by MG-132 induces apoptotic cell death and mitochondrial dysfunction in cultured rat brain oligodendrocytes but not in astrocytes // Glia. 2006. V. 53. P. 891–901.
- Han Y.H.* MG132 as a proteasome inhibitor induces cell growth inhibition and cell death in A549 lung cancer cells via influencing reactive oxygen species and GSH level // Human and Exper. Toxicol. 2010. V. 29. P. 607–614.
- Kadlčiková J., Holeček M., Šafránek R., Tilšer I., Kessler B.M.* Effects of proteasome inhibitors MG132, ZL3VS and AdaAhx<sub>3</sub>L<sub>3</sub>VS on protein metabolism in septic rats // Internat. J. Exper. Pathol. 2004. V. 5. P. 365–371.
- Lloyd D.* Intracellular time-keeping: Epigenetic oscillations reveal the functions of an ultradian clock. In: Ultradian rhythms in life processes // Eds. Lloyd D. and Rossi E.L. London: Springer, 1992. P. 5–22.
- Sharova N.P., Zakharova L.A., Astakhova T.M., Karpova Ya.D., Melnikova V.I., Dmitrieva S.B., Lyupina Yu.V., Erokhov P.A.* New approach to study of T cellular immunity development: Parallel investigation of lymphoid organ formation and changes in immune proteasome amount in rat early ontogenesis // Cell Immunol. 2009. V. 256. P. 47–55.
- Wente M.N., Eibl G., Reber H.A., Friess H., Büchler M.W., Hines O.J.* The proteasome inhibitor MG132 induces apoptosis in human pancreatic cancer cells // Oncology reports. 2005. V. 14. P. 1635–1638.



## Blockade of Proteasome Activity Disturbs the Rhythm of Synthesis of the Protein Marker of Direct Cell–Cell Interactions

V. Ya. Brodskii<sup>a</sup>, N. P. Sharova<sup>a</sup>, L. A. Mal'chenko<sup>a</sup>, D. S. Konchenko<sup>b</sup>,  
T. K. Dubovaya<sup>b</sup>, and N. D. Zvezdina<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia  
e-mail: brodsky.idb@bk.ru

<sup>b</sup> Russian National Research Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117997 Russia

Received July 18, 2014; in final form, August 21, 2014

**Abstract**—The effect of inhibition of proteasome activity on direct cell–cell interactions in primary hepatocyte cultures was studied. The circadian rhythm of protein synthesis was a marker of cell–cell communication. The addition of the proteasome inhibitor MG132 at doses of 10 or 20  $\mu$ M to the medium with hepatocyte cultures for 19 h resulted in a significant reduction in the total pool of <sup>3</sup>H-leucine in cells. The incorporation of leucine into proteins changed slightly or negligibly, whereas the content of free labeled leucine in hepatocytes decreased. The rhythm of protein synthesis was distorted compared to the control. The rhythm was restored by external organizers, such as gangliosides and melatonin, as well as by enhancing the activity of protein kinases—the key factor in the organization of the rhythm of protein synthesis. A short-term (3-h) exposure to MG132 did not change the pool of leucine, but the rhythm of protein synthesis was also disturbed. Thus, protein catabolism affects cell–cell interactions organizing the rhythm of protein synthesis. Another factor of the downregulation of the rhythm of protein synthesis, the secretion of proteins from the hepatocytes in vivo, which was shown in vivo in many studies, was also revealed in our study when measuring the content of proteins stained with Coomassie Brilliant Blue G250 in the medium with hepatocyte cultures.

**Keywords:** cell–cell interactions, proteasomes, inhibitor MG132, circadian rhythms, rhythm of protein synthesis, protein secretion, hepatocytes, Coomassie Brilliant Blue G250