

บทคัดย่อ

แมสปีน หรือ เซอร์ปีน บี5 จัดอยู่ในตระกูลของโปรตีนยับยั้งเซอรินโปรติเอส แมสปีนเป็น เซอร์ปีนที่มีคุณสมบัติด้านมะเร็งเนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญ การลุกลามและแพร่กระจายของ มะเร็งได้ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง แม้ว่ากลไกพื้นฐานการทำงานของแมสปีนยังคงไม่ ชัดเจน ทว่ามีการศึกษามากมายได้นำเสนอวิธีการทำงานของแมสปีนซึ่งรวมถึงการยับยั้งฤทธิ์ของ 26 เอส โปรติเอสโซมภายในเซลล์มะเร็ง วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพิสูจน์ว่าบริเวณทำงาน (อาร์ ซี แอล) ของแมสปีนรับผิดชอบต่อการยับยั้งฤทธิ์ของโปรติเอสโซมหรือไม่ และค้นหาผลกระทบของการ เกิดคอนจูเกชันระหว่างแมสปีนและไอเอสจี15 ต่อระบบการเกิดคอนจูเกชันของยูบิควิติน การใส่ยีน เข้าไปในเซลล์มะเร็งเต้านมเพื่อทำให้มีการแสดงออกของแมสปีน, โอวัลบูมิน หรือ มิวแทนท์ ซึ่งเป็น ลูกผสมระหว่างแมสปีนกับโอวัลบูมินแล้ววิเคราะห์การทำงานของโปรติเอสโซมโดยการวัดด้วยวิธี ฟลูออเรสเซนต์และทำการตรวจสอบคอนจูเกตของยูบิควิติน-โปรตีนด้วยวิธี Western blotting ผลการ ทดลองพบว่าการแสดงออกของแมสปีนและมิวแทนท์ลดฤทธิ์ของโปรติเอสโซมแต่เพิ่มการสะสมคอน จูเกตของยูบิควิติน-โปรตีนในเซลล์ ซึ่งบ่งบอกได้ว่าอาร์ซีแอลของแมสปีนเป็นบริเวณที่เพียงพอแต่ ไม่จำเป็นต่อการทำงานนี้ของแมสปีน นอกจากนี้ การเกิดคอนจูเกชันของแมสปีนกับโปรตีนที่คล้าย ยูบิควิตินที่ชื่อว่า ไอเอสจี15 เกิดขึ้นได้โดยการแสดงออกกรีคอมบิแนนท์แมสปีน, ไอเอสจี15, ยูบิอี1 แอล และ ยูบิซีเอช8 ในเซลล์มะเร็ง ซึ่งถูกวิเคราะห์โดยวิธี nickel pull-down assay และ immunoblotting ระบบไอเอสจี 15 คอนจูเกชันกระตุ้นการสะสมของยูบิควิติน-โปรตีนคอนจูเกตให้ มีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเสนอแนะว่าการดัดแปลงแมสปีนด้วยไอเอสจี15มีบทบาทสำคัญต่อหน้าที่ของ แมสปีนต่อระบบของยูบิควิติน-โปรติเอสโซม ภายในเซลล์

คำหลัก: แมสปีน ไอเอสจี 15 ยูบิควิติน โปรติเอสโซม คอนจูเกชัน

ABSTRACT

Maspin or SERPIN B5 belongs to the serine protease inhibitor superfamily of proteins. Maspin is a tumor suppressor SERPIN because it can inhibit growth, invasion and metastasis of cancer *in vitro* and *in vivo*. Although the underlying mechanism of maspin activity is still mystifying, several reports have proposed models of its actions including the inhibition of 26S proteasome activity of carcinoma cells. The aims of this study are to investigate whether the reactive center loop (RCL) of maspin is responsible for inhibiting the proteasome activity and determine an effect of maspin-ISG15 conjugation on cellular ubiquitin conjugating system. Using mammalian transfection system, 6xHis-FLAG-maspin, -ovalbumin or two maspin/ovalbumin chimeric mutants were expressed in mammary carcinoma cell line MDA-MB-231. The 20S proteasome activity was measured using a fluorometric assay, and the ubiquitin-protein conjugates detected by Western blotting. Expression of wild-type maspin and the mutants decreased the proteasome activity, but increased the accumulation of ubiquitin-protein conjugates indicating that the RCL of maspin is sufficient, but not necessary for its activity. Furthermore, conjugation of maspin by a ubiquitin-like protein, ISG15 was shown by co-expressing recombinant maspin, ISG15, UBE1L, and UbCH8 in the carcinoma cells and analyzed by a nickel pull-down assay and immunoblotting. The accumulation of ubiquitin-protein conjugates was further enhanced by ISG15 conjugation system suggesting that modification by ISG15 play a pivotal role on the function of maspin toward the cellular ubiquitin-proteasome system.

Keywords: Maspin, ISG15, Ubiquitin, Proteasome, Conjugation