

УДК 616-006-091.818:615.277.3

[https://doi.org/ 10.20538/1682-0363-2018-3-96–104](https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-96-104)

Для цитирования: Носарева О.А., Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Шахристова Е.В., Орлов Д.С., Новицкий В.В. Убиквитин и регуляция апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3): 96–104.

Убиквитин и регуляция апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat

Носарева О.А.¹, Степовая Е.А.¹, Рязанцева Н.В.²,
Шахристова Е.В.¹, Орлов Д.С.¹, Новицкий В.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

² Сибирский федеральный университет
Россия, 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Одной из актуальных задач медицины является изучение молекулярных механизмов селективного управления апоптотической гибелью опухолевых клеток в результате конформационных изменений белковых молекул (убиквитинилирования).

Цель исследования: установить роль убиквитина и убиквитинлигазы в дексаметазон-индуцированном апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat.

Материалы и методы. Интактные и культивированные при дополнительном добавлении индуктора апоптоза дексаметазона в конечной концентрации 10 мкМ опухолевые клетки линии Jurkat. Методом проточной цитофлуориметрии в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и после предварительного воздействия дексаметазоном проводили оценку реализации апоптоза с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидия иодида, количества FAS- и TNF-рецептор 1 положительных клеток со сниженным митохондриальным потенциалом. Методом вестерн-блоттинга определяли содержание транскрипционных факторов NF-κB, Araf-1; убиквитина и убиквитинлигазы; активность каспазы-3 регистрировали спектрофлуориметрическим методом.

Результаты. При добавлении дексаметазона – индуктора апоптоза – в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat установлено снижение концентрации убиквитина и возрастание содержания убиквитинлигазы на фоне активации рецепторного (увеличение доли аннексин-, FAS- и TNF- рецептор 1 положительных клеток) и митохондриального (возрастание числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом и содержания транскрипционного фактора Araf-1) путей апоптоза по сравнению с интактной культурой опухолевых клеток. Завершенность апоптоза оценивали, определяя активность каспазы-3 в изучаемых клетках.

Выводы. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что процесс убиквитинилирования белков-регуляторов и белков-эффекторов программированной гибели является одним из молекулярных механизмов регуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Ключевые слова: убиквитин, убиквитинлигаза, апоптоз, дексаметазон, опухолевые клетки линии Jurkat.

✉ Носарева Ольга Леонидовна, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день проблема патогенеза опухолевого роста продолжает занимать одну из ведущих позиций современной медицины. Несмотря на развитие новых медицинских технологий и способов лечения злокачественных новообразований, до сих пор отмечается неуклонный рост числа онкологических больных. В настоящее время активно ведется поиск потенциальных молекулярных мишеней регуляции пролиферации и клеточной гибели опухолевых клеток. В связи с этим выяснение молекулярных механизмов дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток служит обоснованием персонализированных подходов таргетной терапии злокачественных новообразований. Актуальным направлением фундаментальной науки является изучение эндогенной и экзогенной регуляции программированной гибели опухолевых клеток [1–3]. Дисрегуляция апоптоза при опухолевой прогрессии зависит от функционирования про- и антиапоптогенных белков [4–5]. Про- и антиапоптогенные факторы белковой природы представляют собой потенциальные мишени для селективного управления апоптозом путем их убиквитинилирования, так как поли- и моноубиквитинилирование субстрата с помощью убиквитинлигазы является не только сигналом для протеасомной деградации белка, но и в ряде случаев сопровождается изменениями его функциональных свойств [6, 7]. В связи с этим представляется актуальным исследование роли убиквитина и убиквитинилирования белков в дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток.

Целью настоящего исследования явилось установление роли убиквитина и убиквитинлигазы в дексаметазон-индуцированном апоптозе опухолевых клеток линии Jurkat.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования была использована опухолевая клеточная линия Jurkat («Т-лимфобластная лейкемия человека») из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Для дальнейшего анализа клетки были разделены на две группы: интактная культура клеток и культура клеток с добавлением индуктора апоптотической гибели дексаметазона (Sigma-Aldrich, США) в среду культивирования в виде водного раствора в конечной концентрации 10 мкМ в течение 18 ч [8]. Клетки опухолевой линии культивировали с соблюдением условий стерильности в полной питательной среде (90% RPMI-1640

(«Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной сыворотки телят (Invitrogen, США), подвергнутой инактивации в течение 30 мин при температуре 56 °С, с добавлением 2 мМ Нерес (Flow, Великобритания), гентамицина (100 мкг/мл) (KRKA, Словения) и L-глутамин (0,3 мг/мл) («Вектор-Бест», Россия) в полуоткрытой системе при температуре 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ в течение 18 ч. Для постановки эксперимента использовали культуры, которые содержали 95% и более жизнеспособных лимфобластных клеток линии Jurkat. Оценку данного параметра проводили методом микроскопии, используя 0,4%-й раствор трипанового синего (Serva, США). После инкубации клетки трижды отмывали 0,01 М натрий-фосфатным буфером (рН = 7,4) и использовали TNF-рецептор 1 для определения числа FAS-позитивных апоптотически измененных клеток и клеток со сниженным митохондриальным потенциалом. Для оценки содержания белков Araf-1, NF-κB, убиквитина и убиквитинлигазы (EC 6.3.2.19) клеточный лизат (4 × 10⁶ клеток/мл) готовили с использованием смеси ингибиторов протеаз согласно протокола фирмы производителя (Amresco, США). Для определения активности каспазы-3 и содержания общего белка суспензию клеток (4 × 10⁶ клеток/мл) ресуспендировали в буфере с добавлением 1% тритона X-100 (Sigma-Aldrich, США) и затем выдерживали на льду.

Методом проточной цитофлуориметрии (FACS Canto™ II (Becton Dickinson, США) с применением программного обеспечения FACSDiva Version 6.1.3 (Becton Dickinson, США)) проводили оценку количества апоптотических опухолевых клеток путем специфического связывания FITC-меченного аннексина V с фосфатидилсеринном мембраны и пропидия йодида с молекулой ДНК (Annexin v fitc Kit Trevigen, США). Осуществляли расчет числа клеток, презентующих на цитоплазматической мембране FAS-рецептора, с использованием соответствующих моноклональных антител, имеющих FITC-метку согласно протокола фирмы производителя (R&D Systems, США), а также количества клеток, имеющих на своей поверхности TNF-рецептор 1, с использованием моноклональных антител, конъюгированных с фикоэритрином согласно протокола фирмы производителя (R&D Systems, США). Осуществляли расчет числа клеток, имеющих снижение трансмембранного митохондриального потенциала путем применения флуорохрома 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолилкарбоцианин йодида (JC-1) (Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit

Becton Dickinson Biosciences, США) [9, 10]. Результат исследования представляли в процентах от общего числа изучаемых клеток.

Содержание транскрипционных факторов NF-κB, Araf-1; убиквитина и убиквитинлигазы определяли методом вестерн-блоттинга с использованием первичных моноклональных антител к NF-κB (активной субъединице p65 – RelA) (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 1000, Araf-1 (R&D Systems, США) 0,25–0,5 мкг/мл, убиквитину (Sigma-Aldrich, США) – 1 : 1000, убиквитинлигазе (Sigma-Aldrich, США) 1,0 мкг/мл. Содержание изучаемых белков рассчитывалось относительно внутриклеточной концентрации референсного белка β-актина (Sigma-Aldrich, США) с применением программного обеспечения ImageJ2x Version 2.1.4.7 (Wayne Rasband National Institutes of Health, США). Полученные результаты представляли в условных единицах (у.е.).

Активность каспазы-3 (ЕС 3.4.22.56) определяли спектрофлуориметрическим методом по способности избирательного гидролиза ферментом субстрата N-acetyl-(Asp-Glu-Val-Asp)-7-amino-4-methylcoumarin (Sigma-Aldrich, США) с образованием флуоресцирующего продукта amino-4-methylcoumarin (длина возбуждения флуоресценции 380 нм, длина поглощения 430–460 нм). Активность фермента представляли в пМ освобождаемого продукта реакции за 1 мин на 1 мг белка в пробе [11, 12].

Концентрацию общего белка в клеточном лизате определяли методом М.М. Бредфорда по взаимодействию красителя Кумасси голубого G-250 с остатками аминокислот лизина и аргинина белковых молекул и максимуму поглощения при длине волны 595 нм [13], используя калибровочный график, построенный на основе стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 10–100 мкг белка/мл.

Полученные результаты подвергали математическому анализу, используя пакет программ Statistica for Windows (версия 6.0). Для проверки нормальности распределения показателей использовали критерий Шапиро – Уилки. При отсутствии нормального распределения данные представляли в виде медианы Me , верхнего Q_1 и нижнего Q_3 квартилей. Для оценки статистической значимости различий независимых выборок применяли ранговый непараметрический U-критерий Манна – Уитни. Наличие связи между показателями определяли с использованием корреляционного анализа по методу Спирмена. Различия интерпретировали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$ [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск молекулярных мишеней для регуляции и коррекции апоптоза клеток обоснован высокой заболеваемостью и смертностью при онкологической патологии [15, 16]. Для расширения существующих фундаментальных представлений о дизрегуляции апоптоза при опухолевой прогрессии адекватным объектом являются лимфобластные клетки линии Jurkat, в которых присутствуют компоненты как рецепторного, так и митохондриального путей апоптотической гибели. На сегодняшний день известны две основные протеолитические системы, участвующие в реализации апоптоза, – каспазы и протеасомы [6].

Одним из классических эффекторов апоптоза является глюкокортикоид дексаметазон (11β,17α,21-тригидрокси-16α-метил-9α-фторпрегна-1,4-диен-3,20-дион), который, взаимодействуя с внутриклеточными рецепторами, инициирует транскрипцию генов, что сопровождается, в том числе, возрастанием содержания каспазы-8 и каспазы-3 [17, 18].

В условиях дополнительного внесения дексаметазона в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat происходила активация апоптоза, о чем свидетельствовало статистически значимое увеличение количества аннексин-положительных клеток в 8,0 раза ($p = 0,004$) и активности эффекторного фермента апоптоза каспазы-3 – в 4,0 раза ($p = 0,004$) относительно результатов, полученных в интактных лимфобластных клетках линии Jurkat (табл. 1).

В условиях дополнительного добавления дексаметазона в среду культивирования происходило увеличение экспрессии рецепторов фактора некроза опухолей, выражающееся в статистически значимом увеличении количества FAS-позитивных клеток в 7,0 раза ($p = 0,004$) и TNF-рецептор 1 позитивных клеток в 3,0 раза ($p = 0,009$), содержания проапоптотического фактора транскрипции Araf-1 – в 1,1 раза ($p = 0,004$) и числа клеток со сниженным митохондриальным потенциалом – в 3,2 раза ($p = 0,004$) относительно результатов, полученных в интактных лимфобластных клетках линии Jurkat (см. табл. 1), что свидетельствовало об активации рецепторного и митохондриального путей апоптоза.

В формировании клеточного ответа важную роль играет активация рецепторного пути передачи сигнала, продукция внутриклеточных посредников в ответ на воздействие эффектора [19–21].

Показатели, характеризующие рецепторный и митохондриальный пути апоптоза в интактных опухолевых клетках линии Jurkat и при добавлении дексаметазона, $Me(Q_1-Q_3)$
Characteristics describing receptor and mitochondrial pathways of apoptosis in the intact Jurkat tumor cells and in the presence of dexamethasone, $Me(Q_1-Q_3)$

Показатель Characteristic	Группа Group	
	Jurkat, $n = 6$	Jurkat + дексаметазон, $n = 6$ Jurkat + dexamethasone, $n = 6$
Содержание аннексин V-положительных клеток, % Percentage of Annexin V-positive cells, %	5,20 (4,00–5,60)	41,50 (35,30–42,10) $p = 0,004$
Содержание FAS-положительных клеток, % Percentage of FAS-positive cells, %	4,30 (2,12–8,90)	30,10 (27,90–38,80) $p = 0,004$
Содержание TNF-рецептор 1 положительных клеток, % Percentage of TNF-receptor 1 positive cells, %	9,56 (7,32–14,20)	28,45 (22,30–32,10) $p = 0,009$
Содержание клеток со сниженным митохондриальным потенциалом, % Percentage of cells with impaired mitochondrial function, %	18,00 (15,10–19,00)	58,00 (54,10–62,90) $p = 0,004$
Количество NF-κB, у.е. Amount of NF-κB, units	3,106 (3,095–3,128)	2,797 (2,672–2,815)
Количество Араф-1, у.е. Amount of Араф-1, units	1,884 (1,856–1,917)	2,128 (2,115–2,225) $p = 0,004$
Активность каспазы-3, пМ/мин × мг белка Activity of caspase-3, pM/min × mg protein	36,58 (22,66–43,89)	145,97 (132,26–148,69) $p = 0,004$

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2: p – уровень значимости различий по сравнению с интактными опухолевыми клетками линии Jurkat.

N o t e. Here and in the table 2: p – significance point of differences as compared to the intact Jurkat tumor cells.

Белковые молекулы принимают непосредственное участие в трансдукции внутриклеточного сигнала, регуляции активности ферментов, связывания факторов транскрипции с ДНК, трансляции, фолдинге и рефолдинге белка. Основываясь на полученных данных, а именно количестве клеток, несущих на своей поверхности FAS-рецептор и TNF-рецептор 1, можно сделать вывод о большем средстве дексаметазона к FAS-опосредованной стимуляции апоптоза опухолевых клеток линии Jurkat.

Наряду с этим активация апоптотической программы опухолевых клеток или их выживание напрямую зависят от энергетической функции митохондрий. Изменение протонного градиента в межмембранном пространстве митохондрий вероятнее всего связано с повышенной проницаемостью внутренней мембраны органелл путем порообразования. Снижение трансмембранного потенциала митохондрий может быть связано с выходом цитохрома С через поры в цитоплазму клеток и его потерей из цепи переноса электронов. В цитоплазме цитохром С при участии транскрипционного фактора Араф-1 образует

апоптосому, тем самым опосредуя активацию митохондриального пути апоптотической гибели лимфобластных клеток линии Jurkat. Снижение трансмембранного митохондриального потенциала в клетках может свидетельствовать о потере электронов из дыхательной цепи митохондрий, что способствует развитию окислительного стресса, и, в свою очередь, сопровождается накоплением окислительно-модифицированных макромолекул [22]. Накопление окислительно-модифицированных белков способствует активации деградации с участием убиквитина и протеасом [6, 23]. Помимо этого некоторые белковые молекулы способны изменять свою функциональную активность путем убиквитин-зависимого протеолиза [6, 7, 24].

В лимфобластных клетках линии Jurkat воздействие активатора апоптоза (дексаметазона) в конечной концентрации 10 мкМ сопровождалось статистически значимым снижением содержания убиквитина в 2,0 раза ($p = 0,004$) и увеличением концентрации убиквитинлигазы в 1,3 раза ($p = 0,005$) по сравнению с показателями в интактных опухолевых клетках (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
T a b l e 2

Показатели, характеризующие убиквитин-зависимую модификацию белков интактных опухолевых клеток линии Jurkat и при добавлении дексаметазона, <i>Me</i> (Q_1-Q_3) Characteristics describing ubiquitin-dependent protein modification in the intact Jurkat tumor cells and in the presence of dexamethasone, <i>Me</i> (Q_1-Q_3)		
Показатель Characteristic	Группа Group	
	Jurkat <i>n</i> = 6	Jurkat + дексаметазон, <i>n</i> = 6 Jurkat + dexamethasone, <i>n</i> = 6
Содержание убиквитина, у.е. Amount of ubiquitin, units	3,177 (3,099–3,412)	1,620 (1,608–1,631) <i>p</i> = 0,004
Содержание убиквитинлигазы, у.е. Number of ubiquitin E3 ligase, units	1,672 (1,588–1,711)	2,190 (2,118–2,304) <i>p</i> = 0,005

Участие убиквитин-зависимой модификации белков в реализации рецепторного пути апоптоза подтверждалось наличием отрицательных корреляционных связей между содержанием убиквитинлигазы и количеством аннексин V-положительных клеток ($r = -0,81$; $p < 0,05$), а также содержанием убиквитинлигазы и числом TNF-рецептор 1 положительных клеток ($r = -0,83$; $p < 0,05$) в интактных лимфобластных клетках линии Jurkat.

Увеличение содержания фермента (убиквитинлигазы) на фоне снижения концентрации одного из субстратов реакции (убиквитина) свидетельствует об активации убиквитин-зависимого пути деградации белковых молекул. В случае дополнительного внесения дексаметазона в среду культивирования опухолевых клеток линии Jurkat содержание активной формы транскрипционного фактора NF-κB не имело статистически значимых различий по сравнению с интактной культурой опухолевых клеток (см. табл. 1). Известно, что убиквитинилирование предварительно фосфорилированной ингибиторной субъединицы (I-κB) с последующей деградацией на протеасоме лежит в основе активации транскрипционного фактора NF-κB [6]. На основании полученных результатов содержания NF-κB в опухолевых клетках линии Jurkat при дополнительном внесении в среду культивирования дексаметазона можно сделать предположение, что NF-κB не является мишенью воздействия глюкокортикоида (см. табл. 1). Вероятнее всего, проапоптотический механизм действия индуктора апоптоза – дексаметазона – опосредован через активацию с помощью убиквитин-зависимого частичного протеолиза и убиквитин-зависимой модификации, других белков-эффекторов и белков-регуляторов рецепторного и митохондриального путей апоптотической гибели лимфобластных клеток линии Jurkat. Так,

рядом исследователей роль убиквитин-зависимого протеолиза и убиквитин-зависимой модификации белков была показана не только в регуляции активности апоптоз-регулирующих протеинов (с-Fos, с-Myc, NF-κB, AP-1, p53), но и белков, контролирующих клеточный цикл, белков семейства Bcl-2, регулирующих выход цитохрома C из митохондрий, активность каспаз, участвующих в проведении проапоптотического сигнала [6, 25]. Помимо этого, проведенный нами корреляционный анализ позволил установить, что высокая концентрация убиквитина и его участие в убиквитинлигазной реакции вызывали снижение количества апоптоз-индуцирующих рецепторов и аннексина V на цитоплазматической мембране, таким образом способствуя дисрегуляции апоптоза в интактных лимфобластных клетках линии Jurkat.

Установленное нами в условиях воздействия дексаметазона снижение концентрации убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat обусловлено его участием в качестве субстрата моно- и полиубиквитинилирования белков-мишеней. При этом получение белком убиквитиновой метки является сигналом к его модификации или изменению локализации в клетке и воспринимается как часть механизма сигнальной трансдукции. Вероятнее всего, дексаметазон способствовал накоплению необратимо модифицированных протеинов, что сопровождалось изменением функциональной активности белков-регуляторов и белков-эффекторов апоптоза, а также активацией убиквитин-зависимой деградации протеинов. Поиск молекулярных механизмов регуляции апоптоза опухолевых клеток открывает широкие перспективы для разработки медицинских технологий персонализированной терапии онкологических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что дексаметазон-индуцированная активация апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat на фоне снижения концентрации убиквитина и увеличения содержания убиквитинлигазы, принимающих участие в убиквитин-зависимой модификации протеинов, опосредована компонентами рецепторного и митохондриального пути программированной гибели. Одним из механизмов индукции апоптоза опухолевых клеток является накопление убиквитиновых белковых конъюгатов. В связи с этим управление процессом убиквитинилирования белков-регуляторов и белков-эффекторов программированной гибели клеток выступает в качестве потенциальной молекулярной мишени регуляции апоптоза при опухолевой прогрессии. Поскольку конформация и модификация белков играет важную роль в реализации и регуляции каскада ферментативных реакций, ведущих клетку к развитию апоптотической гибели, компоненты убиквитин-зависимой системы представляют собой потенциальную мишень для таргетной терапии. Это позволит повысить эффективность существующих методов патогенетически обоснованной терапии ряда опухолевых заболеваний, сопровождающихся дисрегуляцией апоптоза.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Носарева О.Л. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Степовая Е.А. – разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи, окончательное утверждение для публикации рукописи. Рязанцева Н.В. – анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи. Шахристова Е.В. – анализ и интерпретация данных, написание рукописи статьи. Орлов Д.С. – проведение практической части исследования, анализ и интерпретация данных. Новицкий В.В. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, окончательное утверждение для публикации рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки

молодых российских ученых – кандидатов наук (грант № МК-1742.2017.7).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hampton M.B., O'Connor K.M. Peroxiredoxins and the regulation of cell death. *Mol. Cells.* 2016; 39 (1): 72–76. DOI: 10.14348/molcells.2016.2351.
2. Liberman A.C., Refojo D., Antunica-Noguerol M., Holsboer F., Arzt E. Underlying mechanisms of cAMP- and glucocorticoid-mediated inhibition of FasL expression in activation-induced cell death. *Mol. Immunol.* 2012; 50 (4): 220–235. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.01.008.
3. Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Nosareva O.L., Konovalova E.V., Orlov D.S., Naumova A.I., Didenko S.A., Vesnina O.N., Shakhristova E.V., Zima A.P., Novitskiy V.V. Role of heat shock protein 27 in regulation of glutathione system and apoptosis of Jurkat tumor cells and blood lymphocytes. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2015; 158 (3): 377–379. DOI: 10.1007/s10517-015-2766-3.
4. Aslan M., Canatan D. Modulation of redox pathways in neutrophils from sickle cell disease patients. *Exp. Hematol.* 2008; 36 (11): 1535–1544. DOI: 10.1016/j.exphem.2008.07.004.
5. Martínez-Reyes I., Cuezva J.M. The H(+)-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1837 (7): 1099–1112. DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.03.010.
6. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах. *Цитология.* 2010; 52 (4): 277–300. [Tsimokha A.S. Proteasomes: their role in cellular processes. *Tsitologiya – Cytology.* 2010; 52 (4): 277–300 (in Russ.)].
7. Pajares M., Jiménez-Moreno N., Dias I.H., Debelec B., Vucetic M., Fladmark K.E., Basaga H., Ribaric S., Milisav I., Cuadrado A. Redox control of protein degradation. *Redox Biol.* 2015; 6: 409–420. DOI: 10.1016/j.redox.2015.07.003.
8. Кайгородова Е.В., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Марошкина А.Н., Белкина М.В., Чечина О.Е., Зима А.П. Действие ингибиторов белков теплового шока 90 и 27 на дексаметазон-индуцированный апоптоз опухолевых клеток. *Бюллетень сибирской медицины.* 2010; 3: 68–72. [Kaygorodova E.V., Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V., Maroshkina A.N., Belkina M.V., Chechina O.E., Zima A.P. The effects of heat shock protein 90 and 27 inhibitors on dexamethasone-induced apoptosis in tumor cells. *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine.* 2010; 3: 68–71 (in Russ.)].
9. Castedo M., Hirsch T., Susin S.A., Zamzami N., Marchetti P., Macho A. et al. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.* 1996; 157 (2): 512–521.
10. Perry S.W., Norman J.P., Barbieri J., Brown E.B., Gelbard H.A. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques.* 2011; 50 (2): 98–115. DOI: 10.2144/000113610.
11. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997; 326 (1): 1–16.

12. Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999; 6(11): 1028–1042. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400598.
13. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72: 248–254.
14. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. Москва: Практика, 1999: 459. [Glants S. Biomedical statistics. Moscow: Praktika Publ., 1999: 459 (in Russ.)].
15. Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science.* 2014; 345 (6203): 1250256. DOI: 10.1126/science.1250256.
16. Kennedy D., Jager R., Mosser D.D., Samali A. Regulation of apoptosis by heat shock proteins. *IUBMB Life.* 2014; 66 (5): 327–338. DOI: 10.1002/iub.1274.
17. Pandolfi J., Baz P., Fernández P., Discianni Lupi A., Payaslián F., Billordo L.A., Fainboim L., Arruvito L. Regulatory and effector T-cells are differentially modulated by dexamethasone. *Clin. Immunol.* 2013; 149 (3): 400–410. DOI: 10.1016/j.clim.2013.09.008.
18. Tome M.E., Jaramillo M.C., Briehl M.M. Hydrogen peroxide signaling is required for glucocorticoid-induced apoptosis in lymphoma cells. *Free Radic. Biol. & medicine.* 2011; 51 (11): 2048–2059. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.002.
19. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). Москва: Медицина, 2001: 192. [Lushnikov E.F., Abrosimov L.Yu. Cell death (apoptosis). Moscow: Meditsina Publ., 2001: 192 (in Russ.)].
20. Рязанцева Н.В., Носарева О.Л., Степовая Е.А., Закирова Е.В., Наумова А.И., Веснина О.Н., Шахристова Е.В., Орлов Д.С., Якушина В.Д., Новицкий В.В. Система глутатиона участвует в регуляции апоптоза опухолевых клеток. *Бюллетень сибирской медицины.* 2014; 13 (5): 73–78. [Ryazantseva N.V., Nosareva O.L., Stepovaya E.A., Zakirova E.V., Naumova A.I., Vesnina O.N., Shakhristova E.V., Orlov D.S., Yakushina V.D., Novitsky V.V. The role of the glutathione system in the regulation of tumor cell apoptosis. *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine.* 2014; 13 (5): 73–78 (in Russ.)].
21. Driscoll P.C. Structural studies of death receptors. *Metb. Enzymol.* 2014; 545: 201–242. DOI: 10.1016/B978-0-12-801430-1.00009-3.
22. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинико-биохимические аспекты. Санкт-Петербург: Медицинская пресса; 2006: 397. [Dubinina E.E. Products of oxygen metabolism in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). Physiological, clinical and biochemical aspects. St. Petersburg: Medical Press Publ., 2006: 400 (in Russ.)].
23. Носарева О.Л., Степовая Е.А., Рязанцева Н.В., Закирова Е.В., Мазунин И.О., Литвинова Л.С., Сохоневич Н.А., Веснина О.Н., Шахристова Е.В. Нарушения экспрессии мРНК Hsp27 и убиквитина как механизм ускользания опухолевых клеток линии Jurkat от апоптоза. *Бюллетень сибирской медицины.* 2015; 14 (1): 66–72. [Nosareva O.L., Stepovaya E.A., Ryazantseva N.V., Zakirova E.V., Mazunin I.O., Litvinova L.S., Sohonevich N.A., Vesnina O.N., Shakhristova E.V. Disruption of mRNA Hsp27 and ubiquitin expression as a mechanism of escaping from apoptosis of Jurkat tumor cells. *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine.* 2015; 14 (1): 66–72 (in Russ.)].
24. Meier P., Morris O., Broemer M. Ubiquitin-mediated regulation of cell death, inflammation, and defense of homeostasis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2015; 114: 209–239. DOI: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.015.
25. Dnaz V.M., Vicas-Castells R., Garcna de Herreros A. Regulation of the protein stability of EMT transcription factors. *Cell Adb. Migr.* 2014; 8 (4): 418–428. DOI: 10.4161/19336918.2014.969998.

Поступила в редакцию 11.12.2017

Подписана в печать 15.05.2018

Носарева Ольга Леонидовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7441-5554>.

Степовая Елена Алексеевна, д-р мед. наук, профессор, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9339-6304>.

Рязанцева Наталья Владимировна, д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория биолюминесцентных биотехнологий, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, Сибирский федеральный университет, г. Красноярск.

Шахристова Евгения Викторовна, канд. мед. наук, доцент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2938-1137>.

Орлов Дмитрий Сергеевич, ассистент, кафедра биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики, СибГМУ, г. Томск. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7525-0176>.

Новицкий Вячеслав Викторович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, кафедра патофизиологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9577-8370>.

(✉) **Носарева Ольга Леонидовна**, e-mail: olnosareva@yandex.ru.

УДК 616-006-091.818:615.277.3

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-96-104>

For citation: Nosareva O.L., Stepovaya E.A., Ryazantseva N.V., Shakhristova E.V., Orlov D.S., Novitsky V.V. Ubiquitin and regulation of apoptosis in Jurkat cells. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (3): 96–104.

Ubiquitin and regulation of apoptosis in Jurkat cells

Nosareva O.L.¹, Stepovaya E.A.¹, Ryazantseva N.V.², Shakhristova E.V.¹, Orlov D.S.¹, Novitsky V.V.¹

¹ *Siberian State Medical University (SSMU)*

2, Moskow Trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

² *Siberian Federal University (SFU)*

79, Svobodny Av., Krasnoyarsk, 660041, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. One of the crucial tasks in medicine is studying the molecular mechanisms of selective management of tumor cell apoptosis following conformational changes in protein molecules (ubiquitination).

The purpose of the study. The aim of the project is to establish the role of ubiquitin and ubiquitinligase in dexamethasone-induced apoptosis in Jurkat cells.

Materials and methods. The study was carried out on the Jurkat tumor cell line (intact cells and cells cultured in the presence of an apoptosis inducer dexamethasone in the final concentration of 10 μmol. In intact and dexamethasone-affected Jurkat cells, implementation of apoptosis and the amount of FAS-, TNF Receptor 1 and cells with reduced mitochondrial membrane potential were assessed by flow cytometry using FITC-conjugated Annexin V and Propidium Iodide. The levels of NF-κB, Apaf-1, ubiquitin and ubiquitin ligase were determined by Western blot analysis. The activity of caspase-3 was measured by spectrofluorometry.

Results. When adding the apoptosis inducer dexamethasone to the Jurkat cell culture, we registered a fall in the concentration of ubiquitin and a rise in the level of ubiquitinligase against the backdrop of activated receptor- (an increase in the amount of Annexin V positive cells, FAS- and TNF Receptor 1) and mitochondrial-mediated (an increase in the number of cells with reduced mitochondrial membrane potential and elevation of Apaf-1 level) pathways of apoptosis, as opposed to the intact cell culture. We estimated the completion of apoptosis by determining the activity of caspase-3 in the investigated tumor cells.

Conclusion. The obtained findings allow the conclusion that ubiquitination of regulatory and effector proteins in programmed cell death is one of the molecular mechanisms that regulates and selectively controls apoptosis in Jurkat cells.

Key words: ubiquitin; ubiquitinligase; apoptosis; dexamethasone; Jurkat tumor cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The research was carried out as a part of a grant of the president of the Russian Federation for the young scientists (grant No MK – 1742.2017.7).

Received 11.12.2017

Accepted 15.05.2018

Nosareva Olga L., PhD, Associate Professor, Division of Biochemistry and Molecular Biology including Clinical Laboratory Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7441-5554>.

Stepovaya Elena A., DM, Professor, Division of Biochemistry and Molecular Biology including Clinical Laboratory Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9339-6304>.

Ryazantseva Nataliya V., DM, Professor, Leading Research Scientist, Laboratory of Bioluminescent Biotechnologies, Institute of Basic Biology and Biotechnologies, SFU, Krasnoyarsk, Russian Federation.

Shakhrystova Evgeniya V., PhD, Associate Professor, Division of Biochemistry and Molecular Biology including Clinical Laboratory Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2938-1137>.

Orlov Dmitry S., Assistant, Division of Biochemistry and Molecular Biology including Clinical Laboratory Medicine, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7525-0176>.

Novitskiy Vyacheslav V., DM, Professor, Academician of RAS, Pathophysiology Department, SSMU, Tomsk, Russian Federation. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9577-8370>.

(✉) **Nosareva Olga L.**, e-mail: olnosareva@yandex.ru.