

НАРУШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК HSP27 И УБИКВИТИНА КАК МЕХАНИЗМ УСКОЛЬЗАНЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT ОТ АПОПТОЗА

Носарева О.Л.¹, Степовая Е.А.¹, Рязанцева Н.В.¹, Закирова Е.В.¹, Мазунин И.О.², Литвинова Л.С.², Сохоневич Н.А.², Веснина О.Н.¹, Шахристова Е.В.¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, г. Калининград

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – установить взаимосвязь между экспрессией мРНК белка теплового шока 27, убиквитина и реализацией апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

Методом проточной цитофлуориметрии проводили оценку реализации апоптоза с использованием FITS-меченного аннексина V и пропидия иодида, количества активных форм кислорода, спектрофлуориметрическим методом регистрировали активность каспазы-3. Содержание гидроксильного радикала определяли спектрофотометрическим методом. Уровень экспрессии мРНК убиквитина и белка теплового шока 27 – с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Материалом для исследования служили интактные опухолевые клетки линии Jurkat и лимфоциты крови здоровых доноров.

В результате проведенного исследования установлено, что снижение количества аннексин-положительных клеток и активности каспазы-3 сопровождалось увеличением содержания гидроксильного радикала и активных форм кислорода на фоне усиления экспрессии мРНК белка теплового шока 27 и убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: опухолевые клетки линии Jurkat, апоптоз, убиквитин, белок теплового шока 27.

Введение

Одним из фундаментальных механизмов поддержания гомеостаза и регулирования деятельности клеток является запрограммированная гибель. В основе патогенеза злокачественной трансформации лежит ингибирование апоптоза [1–3]. В настоящее время актуальное направление теоретических и практических исследований – поиск внутриклеточных мишеней для селективной регуляции апоптоза опухолевых клеток.

Неотъемлемой частью опухолевой трансформации клеток является формирование окислительного стресса. Активные формы кислорода (АФК) могут индуцировать окислительные повреждения основных макромолекул клетки (липидов, белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов) и их надмолекулярных комплексов различной степени сложности (клеточных

и субклеточных мембран, элементов клеточного «скелета» и т.п.) [4]. Центральную роль в регуляции клеточного ответа на окислительный стресс играет система убиквитин-протеасомной деградации в комплексе с белками теплового шока (Hsp – heat shock proteins) [5], которая используется для удаления многих необратимо поврежденных белков путем их деградации на протеасомах [6, 7].

В проблеме неспецифического ответа клетки на повреждение особое внимание уделяется исследованию взаимосвязей между развитием окислительного стресса и гибелью клеток. Среди индуцируемых окислительным стрессом молекул под пристальным вниманием находятся белки теплового шока, которые, обладая шаперонной активностью, способствуют фолдингу вновь синтезирующихся белков, их последующей сборке в биологически активные олигомерные структуры или рефолдингу денатурированных полипептидных цепей [8–10].

Таким образом, регулирование экспрессии белка теплового шока 27 (Hsp27) и убиквитина может быть

✉ Носарева Ольга Леонидовна, тел. 8-923-411-1951; e-mail: olnosareva@yandex.ru

использовано в качестве молекулярных мишеней управления апоптозом опухолевых клеток.

Цель исследования – установить взаимосвязь между экспрессией мРНК белка теплового шока 27, убиквитина и реализацией апоптоза в опухолевых клетках линии Jurkat.

Материал и методы

Материалом для исследования служили опухолевые клетки линии Jurkat (острый Т-лимфобластный лейкоз человека), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург), и лимфоциты крови.

Лимфоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров (5 мужчин и 6 женщин в возрасте от 20 до 35 лет) путем центрифугирования на градиенте Ficoll-Paque (Pharmacia, Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) [11], далее – на градиенте Перколла (Sigma, США) ($\rho = 1,130 \text{ г/см}^3$) [12], затем ресуспендировали в полной питательной среде (90% RPMI-1640 (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамин («Вектор-Бест», Россия), 100 мкг/мл гентамицин (INS, США), 2 ммоль/мл Нерес (Flow, Великобритания)). Культивирование опухолевых клеток линии Jurkat проводили суспензионным методом в полной питательной среде RPMI-1640. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью 0,5%-го раствора трипанового синего («ДИАЭМ», Германия). Для постановки эксперимента использовались культуры клеток, содержащие не более 5% погибших клеток.

С целью определения активности каспазы-3, содержания гидроксильного радикала и общего белка опухолевые клетки линии Jurkat и лимфоциты крови ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (pH = 7,4) с добавлением 1% тритона X-100, выдерживали на льду и готовили лизат с сохранением стандартной концентрации клеток в 1 мл.

Оценку апоптотических клеток выполняли методом проточной цитофлюориметрии с применением FITC-меченного аннексина V и пропидия иодида (BD Pharmingen, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Метод основан на специфическом связывании FITC-меченного аннексина V с фосфатидилсеринном и способности пропидия иодида (PI) интеркалировать с молекулой ДНК. Подсчет количества FITC⁺/PI⁻ и FITC⁺/PI⁺-меченных клеток осуществляли к общему числу изучаемых клеток и выражали в процентах.

Завершенность апоптоза оценивали по активности каспазы-3 спектрофлюориметрическим методом, прин-

цип которого заключается в способности избирательного гидролиза ферментом синтетического тетрапептидного флюоригенного субстрата N-acetyl-(Asp-Glu-Val-Asp)-7-amino-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC) (Sigma, США) с образованием AMC, который флюоресцировал в диапазоне длин волн 430–460 нм (максимум возбуждения флюоресценции при длине волны 380 нм). Активность каспазы-3 выражали в пикомолях освобожденного amino-4-метилкумарина в минуту на 1 мг белка в пробе [13, 14].

Концентрацию внутриклеточных АФК определяли с помощью красителя с заблокированной флюоресценцией – дихлорфлюоресцеина диацетата (Sigma, США) методом проточной цитофлюориметрии [15]. Дихлорфлюоресцеин диацетат, изначально не флюоресцирующий, способен пассивно проникать внутрь клетки и под действием эстераз переходить в полярное соединение, не способное диффундировать обратно из клетки, которое после взаимодействия с пероксидом водорода превращается во флюоресцирующий метаболит.

Уровень внутриклеточной продукции ОН-радикала в опухолевых клетках и лимфоцитах крови определяли спектрофотометрическим методом, основанным на разрушении модельного субстрата 2-дезоксид-Д-рибозы гидроксильным радикалом, образующимся при опсонизации зимозаном [16].

Концентрацию белка в пробах определяли методом М.М. Бредфорда [17], используя калибровочный график, построенный на основе стандартных растворов бычьего сывороточного альбумина с концентрациями от 1 до 10 мкг на 100 мл.

Выделение мРНК из опухолевых клеток линии Jurkat и лимфоцитов крови осуществляли с помощью набора AXYPREP MULTISOURCE TOTAL RNA MINIPREP kit (Axugen Biosciences, США) согласно протоколу исследования. Количество и качество выделенного препарата мРНК оценивали спектрофотометрически на приборе Pico100 Picodrop μl Spectrophotometer. Синтез комплементарной ДНК осуществляли обратной транскрипцией с помощью набора реагентов MMLV RT kit («Евроген», Россия). Для изучения экспрессии мРНК убиквитина, Hsp27 в клетках проводили полимеразно-цепную реакцию «в реальном времени» с использованием специфических праймеров (табл. 1) и набора реагентов qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия) на амплификаторе RotorGene Q (QIAGEN, Германия). Цикл амплификации: 95 °С 5 мин, 1 цикл; 95 °С 30 с, 62 °С 30 с, 72 °С 1 мин, 45 циклов; 72 °С 5 мин. В качестве нормировочного гена использовали β -актин (β -Actin). Количественное выражение результатов проводилось с по-

мощью расчета разницы экспрессии исследуемого гена относительно контроля (нормировочного гена) по

формуле $E^{-\Delta\Delta C_t}$ [18].

Таблица 1

Специфические праймеры, использованные в работе		
Название	Последовательность 5'→3'	Публикация
Ubiquitin 2Q2 for	CCGTGGGTAGTGGTTGATCT	Seghatoleslam A., Monabati A., Bozorg-Ghalati F. et al. Expression of UBE2Q2, a putative member of the ubiquitin-conjugating enzyme family in pediatric acute lymphoblastic leukemia // Arch Iran Med. 2012. V. 15, № 6. P. 352–355
Ubiquitin 2Q2 rev	AGCGATTCCGCATCGTCAGT	
Hsp27 for	TGGATGTCAACCACTTCGC	Chen C.Y., Chen H.F., Gi S.J. et al. Decreased heat shock protein 27 expression and altered autophagy in human cells harboring A8344G mitochondrial DNA mutation // Mitochondrion. 2011. № 5. P. 739–749
Hsp27 rev	TGGTGTACTCGTTGGACTGC	
β -Actin for	CCTGTACGCCAACACAGTGC	Ho-Pun-Cheung A., Bascoul-Mollevi C., Assenat E. et al. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization // BMC Mol. Biol. 2009. № 15. P. 10–31
β -Actin rev	ATACTCCTGCTTGCTGATCC	

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы Statistica 6.0 for Windows. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде медианы Me , верхнего и нижнего квартилей Q_1 – Q_3 . Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ [19].

Результаты и обсуждение

Основные процессы, определяющие функциональную активность клеток, в том числе запуск и реализация запрограммированной гибели, обеспечиваются за счет мультикаталитических комплексов. Актуальным направлением современной науки является изучение механизмов дисрегуляции апоптоза опухолевых клеток при участии АФК, каспаз, белков семейства TNF, Bcl-2, p53, MAP-киназ, цитокинов, белков теплового шока и других молекул. Данное исследование обусловлено поиском взаимосвязи между нарушением в регуляции апоптотической гибели и формированием окислительного стресса при опухолевой прогрессии. Устойчивость к действию проапоптогенных факторов – одна из главных особенностей опухолевых клеток.

Известно, что апоптоз регулируется двумя протеолитическими системами – семейством каспаз и протеасомами. В проведенном исследовании нами было установлено, что количество аннексин-положительных опухолевых клеток линии Jurkat было снижено в 4,5 раза ($p < 0,05$), а активность каспазы-3 – в 3,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению с лимфоцитами крови здоровых доноров (табл. 2).

Одной из причин выживания злокачественных клеток является повышенный уровень экспрессии белков теплового шока [1]. Механизм модуляции

апоптоза в опухолевых клетках с помощью белков теплового шока различен. Так, например, они способны препятствовать активации каспаз, связываясь непосредственно с цитоплазматической фракцией цитохрома c и Araf-1 [20].

С другой стороны, современная концепция устойчивости опухолевых клеток к механизмам запрограммированной гибели базируется на их способности успешно существовать в условиях окислительного стресса. Нами доказано статистически значимое увеличение внутриклеточной продукции АФК в 4,6 раза ($p < 0,05$) и гидроксильного радикала в 11,3 раза ($p < 0,05$) в клетках опухолевой линии Jurkat по сравнению с лимфоцитами крови здоровых доноров (табл. 2). Механизм повышенной генерации гидроксильного радикала в опухолевых клетках, вероятнее всего, связан с понижением значения pH и активной мобилизацией железа из белковых комплексов [21]. Гидроксильный радикал является наиболее токсичным из активных форм кислорода, проявляя прямое токсическое действие на клеточные биополимеры, в основном на белковые молекулы [4, 21].

Кроме того, прооксидантный сдвиг в редокс-статусе опухолевых клеток, возможно, обусловлен высокой гликолитической активностью и увеличением продукции АФК компонентами дыхательной цепи митохондрий [4, 22]. Таким образом, чрезмерная продукция АФК в опухолевых клетках сопровождается ингибированием апоптоза.

Формирование окислительного стресса в опухолевых клетках неизбежно влечет накопление окислительно-модифицированных протеинов, которые нуждаются в своевременном рефолдинге, а при его несостоятельности подвергаются деградации, в частности с помощью убиквитин-зависимых протеасом.

В результате проведенного исследования было обнаружено статистически значимое увеличение экспрессии мРНК белка теплового шока 27 в 40,7 раз

($p < 0,05$) и убиквитина – в 18,3 раз ($p < 0,05$) в клетках опухолевой линии Jurkat по сравнению с лимфоцитами крови здоровых доноров (табл. 3).

Таблица 2

Содержание аннексин-положительных клеток, активность каспазы-3, содержание АФК и гидроксильного радикала в опухолевых клетках линии Jurkat и в лимфоцитах крови ($Me (Q_1-Q_3)$)		
Показатель	Опухолевые клетки линии Jurkat	Лимфоциты крови
Содержание аннексин-положительных клеток, %	5,20 (4,00–5,60)*	23,12 (21,90–24,50)
Активность каспазы-3, пмоль/мин · мг белка	36,58 (22,66–43,89)*	108,44 (103,48–112,66)
Количество активных форм кислорода, усл. ед.	0,488 (0,456–0,604)*	0,105 (0,099–0,122)
Содержание гидроксильного радикала, нмоль/мг белка	523,00 (415,10–719,37)*	46,17 (36,31–55,04)

Примечание. Здесь и в табл. 3: * – уровень статистической значимости различий по сравнению с лимфоцитами крови.

Таблица 3

Уровень экспрессии мРНК белка теплового шока 27 и убиквитина в опухолевых клетках линии Jurkat и в лимфоцитах крови ($Me (Q_1-Q_3)$)		
Показатель	Опухолевые клетки линии Jurkat	Лимфоциты крови
Уровень экспрессии мРНК белка теплового шока 27, усл. ед.	0,0935 (0,0845–0,2174)*	0,0023 (0,0012–0,0284)
Уровень экспрессии мРНК убиквитина, усл. ед.	0,0165 (0,0045–0,0177)*	0,0009 (0,0005–0,0119)

Полученные данные указывают на формирование окислительного стресса и несостоятельности системы Hsp в обеспечении адекватной скорости рефолдинга протеинов, несмотря на увеличение экспрессии мРНК Hsp27 в опухолевых клетках линии Jurkat. Поэтому повышенная экспрессия мРНК убиквитина в опухолевых клетках по сравнению с лимфоцитами крови необходима для обеспечения адекватной скорости деградации окислительно-модифицированных белков на протеасомах при помощи убиквитинирования. Реакция убиквитинирования осуществляется каскадом ферментов, обеспечивающих ковалентное присоединение убиквитина к окисленному протеину. Но при этом дополнительное фосфорилирование окисленного белка или его взаимодействие с белками теплового шока облегчает процесс убиквитинирования. В качестве мишени для убиквитинирования могут выступать факторы транскрипции, регулирующие запрограммированную гибель клеток. Так, активация антиапоптогенного фактора транскрипции NF- κ B находится под управлением убиквитин-зависимых протеасом [6].

Таким образом, избыточное количество окислительно-модифицированных метаболитов в нормальной клетке могло привести к инициации запрограммированной клеточной гибели [21]. В опухолевых клетках линии Jurkat увеличение количества не только Hsp27 [23], но и убиквитина – механизм защиты от апоптоза.

Заключение

Убиквитин и Hsp27 не только вносят существенный вклад в регулирование редокс-баланса, но и являются факторами ускользания от запрограммированной клеточной гибели опухолевых клеток линии Jurkat, способствуя поддержанию их жизнедеятельности и оптимальному функционированию в условиях окислительного стресса.

Поиск подходов к коррекции дисрегуляции апоптоза и индуцированных окислительным стрессом нарушений функций клеток открывает широкие перспективы для медицинской практики молекулярных технологий. Это позволит повысить эффективность существующих методов патогенетической терапии большого числа социально-значимых заболеваний. В связи с этим управление процессом убиквитинирования можно рассматривать как потенциальную молекулярную мишень регуляции апоптоза при опухолевой прогрессии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – докторов наук № МД-4999.2012, стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-454.2013.4.

Литература

1. Рязанцева Н.В., Кайгородова Е.В., Марошкина А.Н. и др. Модулирующие апоптоз эффекты белков теплового шока: влияние шаперона Hsp27 на белки семейства Bcl-2 в опухолевых клетках линии Jurkat // Вопросы онкологии. 2012. Т. 58, № 4. С. 541–544.
2. Negroni L., Samson M., Guignon J.M. et al. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation // Cancer Ther. 2007. V. 6, № 10. P. 2747–2756.
3. Saveleva O.E., Anishchenko E.A., Novitsky V.V., Riazantseva N.V. The role of transcription factors in cytokine-mediated apoptosis of lymphocytes // International Journal of Biology. 2012. V. 4, № 1. P. 129–137.
4. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции // Кислород и антиоксиданты. 2009. № 1. С. 3–64.
5. Ramakrishna S., Suresh B., Baek K.-H. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis // Cell. Mol. Life Sci. 2011. № 68. P. 15–26.
6. Цимоха А.С. Протеасомы: участие в клеточных процессах // Цитология. 2010. Т. 52, № 4. С. 271–300.
7. Raab S., Drechsel G., Zarepour M. et al. Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in Arabidopsis // Plant J. 2009. V. 59, № 1. P. 39–51.
8. Мельников Э.Э., Ротанова Т.В. Молекулярные шапероны // Биоорганическая химия. 2010. Т. 36, № 1. С. 5–14.
9. Рязанцева Н.В., Кайгородова Е.В., Новицкий В.В. и др. Молекулярные участники рецепторного пути регуляции апоптоза в опухолевых и нормальных лимфоцитах в условиях ингибирования белка теплового шока 90 *in vitro* // Сиб. онколог. журн. 2011. Т. 2, № 44. С. 52–56.
10. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death // Mol. Cell. 2010. V. 40, № 2. P. 253–266.
11. Bignold L.P., Ferrante A. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method // J. Immunol. Methods. 1987. V. 96, № 1. P. 29–33.
12. Ulmer A.J., Flad H.D. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocytes using Percoll as gradient medium // J. Immunol. Methods. 1979. V. 30, № 1. P. 1–10.
13. Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis // Biochem. J. 1997. V. 326. P. 1–16.
14. Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death // Cell Death and Differentiation. 1999. V. 6. P. 1028–1042.
15. Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation // J. Immunol. 1983. V. 130. P. 1910–1917.
16. Thom S.R., Elbaken M.E. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation // Free Radical Biol. Med. 1991. V. 10, № 6. P. 413–426.
17. 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. V. 7, № 1, 2. P. 248–254.
18. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method // Nat. Protoc. 2008. V. 3, № 6. P. 1101–1108.
19. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. 459 с.
20. Beere H.M. “The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis // Cell Sci. 2004. V. 117, № 13. P. 2641–2651.
21. Дубинина Е.Е., Пустыгина А.В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Украинский биохим. журн. 2008. Т. 80, № 6. С. 5–18.
22. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
23. Stetler R.A. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury // Curr. Mol. Med. 2009. V. 9, № 7. P. 863–872.

Поступила в редакцию 24.11.2014 г.

Утверждена к печати 04.02.2015 г.

Носарева Ольга Леонидовна (✉) – канд. мед. наук, ст. преподаватель кафедры биохимии и молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).**Степовая Елена Алексеевна** – д-р мед. наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).**Рязанцева Наталья Владимировна** – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики СибГМУ (г. Томск).**Закирова Елена Валерьевна**, кафедра биохимии и молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).**Мазунин Илья Олегович** – канд. биол. наук, доцент Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта (г. Калининград).**Литвинова Лариса Сергеевна** – д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта (г. Калининград).**Сохоневич Н.А.** – мл. науч. сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий инновационного парка Балтийского федерального университета им. Иммануила Канта (г. Калининград).**Веснина О.Н.**, кафедра биохимии и молекулярной медицины СибГМУ (г. Томск).**Шахристова Евгения Викторовна** – канд. мед. наук, руководитель НОЦ молекулярной медицины ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).✉ **Носарева Ольга Леонидовна**, тел. 8-923-411-1951; e-mail: olnosareva@yandex.ru

DISRUPTION OF EXPRESSION OF MRNA HSP27 AND UBIQUITIN AS A MECHANISM OF ESCAPING OF JURKAT LINE TUMOR CELLS FROM APOTOSIS

Nosareva O.L.¹, Stepovaya Ye.A.¹, Ryazantseva N.V.¹, Zakirova Ye.V.¹, Mazunin I.O.², Litvinova L.S.², Sokhnevich N.A.², Vesnina O.N.¹, Shakhristova Ye.V.¹

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

ABSTRACT

The research objective is to establish the link between heat shock protein 27 and ubiquitin mRNA expression as well as Jurkat tumor cell apoptosis.

The method of flow cytometry has been used to evaluate apoptosis realization using FITC-labeled annexin V and propidium iodide along with the amount of reactive oxygen species. Spectrofluorimetry has been applied to register the caspase-3 activity. The content of hydroxyl radicals has been determined by spectrophotometry. The level of ubiquitin and heat shock protein 27 mRNA expression has been identified using real-time PCR. Intact Jurkat tumor cells and blood lymphocytes of healthy donors served the material for the research.

Following the carried out research it has been found out that the fall in the amount of annexin V positive cells and the reduced caspase-3 activity were accompanied by the rise in the content of hydroxyl radicals and reactive oxygen species against the backdrop of the increased heat shock protein 27 and ubiquitin mRNA expression in Jurkat tumor cells.

KEY WORDS: Jurkat tumor cells, apoptosis, ubiquitin, heat shock protein 27.

Bulletin of Siberian Medicine, 2015, vol. 14, no. 1, pp. 66–72

References

- Ryazantseva N.V., Kaigorodova Ye.V., Maroshkina A.N. et al. The effects of proteins of thermal shock modulating apoptosis: influence of the chaperon of Hsp27 on proteins of Bcl-2 family in tumor cells of the Jurkat line. *Voprosy onkologii – Problems in Oncology*, 2012, vol. 58, no. 4, pp. 541–544 (in Russian).
- Negróni L., Samson M., Guignonis J.M. et al. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation. *Cancer Ther.*, 2007, vol. 6, no. 10, pp. 2747–2756.
- Saveleva O.E., Anishchenko E.A., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. The role of transcription factors in cytokine-mediated apoptosis of lymphocytes. *International Journal of Biology*, 2012, vol. 4, no. 1, pp. 129–137.
- Zenkov N.K., Men'shchikova E.B., Tkachev V.O. Some principles and mechanisms of redox-regulation. *Kislород i antioksidanty – Oxygen and Antioxidants*, 2009, no. 1, pp. 3–64 (in Russian).
- Ramakrishna S., Suresh B., Baek K.-H. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, no. 68, pp. 15–26.
- Cimoha A.S. Proteasoma: participation in cellular processes. *Cytology*, 2010, vol. 52, no. 4, pp. 271–300.
- Raab S., Drechsel G., Zarepour M. et al. Identification of a novel E3 ubiquitin ligase that is required for suppression of premature senescence in Arabidopsis. *Plant J.*, 2009, vol. 59, no. 1, pp. 39–51.
- Mel'nikov E.E., Rotanova T.V. Molecular chaperons. *Boorganicheskaya khimiya – Bioorganic Chemistry*, 2010, vol. 36, no. 1, pp. 5–14 (in Russian).
- Ryazantseva N.V., Kaigorodova Ye.V., Novitsky V.V. et al. Molecular participants of a receptor way of regulation of apoptosis in tumoral and normal lymphocytes in the conditions of inhibition of protein of thermal shock of 90 *in vitro*. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal – Siberian Journal of Oncology*, 2011, vol. 2, no. 44, pp. 52–56 (in Russian).
- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell.*, 2010, vol. 40, no. 2, pp. 253–266.
- Bignold L.P., Ferrante A. Mechanism of separation of polymorphonuclear leukocytes from whole blood by the one-step Hypaque-Ficoll method. *J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 96, no. 1, pp. 29–33.
- Ulmer A.J., Flad H.D. Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leukocytes using Percoll as gradient medium. *J. Immunol. Methods*, 1979, vol. 30, no. 1, pp. 1–10.
- Cohen G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, 1997, vol. 326, pp. 1–16.
- Nicholson D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 1999, vol. 6, pp. 1028–1042.
- Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R. et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.*

- 1983, vol. 130, pp. 1910–1917.
16. Thom S.R., Elbuken M.E. Oxygen-dependent antagonism of lipid peroxidation. *Free Radical Biol. Med.*, 1991, vol. 10, no. 6, pp. 413–426.
 17. 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, vol. 7, no. 1, 2, pp. 248–254.
 18. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. *Nat. Protoc.*, 2008, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108.
 19. Glants S. *Medicobiological statistics*. Moscow, Practice Publ., 1999. 459 p. (in Russian).
 20. Beere H.M. “The stress of dying”: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Cell Sci.*, 2004, vol. 117, no. 13, pp. 2641–2651.
 21. Dubinina E.E., Pustygina A.V. Oxidizing modification of proteins, its role at pathological states. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal – The Ukrainian Biochemical Magazine*, 2008, vol. 80, no. 6, pp. 5–18 (in Russian).
 22. Men'shhikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. et al. *Oxidizing stress: Pathological states and diseases*. Novosibirsk, ARTA Publ., 2008. 284 p. (in Russian).
 23. Stetler R.A. HSP27: mechanisms of cellular protection against neuronal injury. *Curr. Mol. Med.*, 2009, vol. 9, no. 7, pp. 863–872.

Nosareva O.L. (✉), Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Stepovaya Ye.A., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Ryazantseva N.V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Zakirova Ye.V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Mazunin I.O., Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

Litvinova L.S., Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

Sokhonevich N.A., Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation.

Vesnina O.N., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

Shakhrystova Ye.V., Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation.

✉ **Nosareva Olga L.**, Ph. +7-923-411-1951; e-mail: olnosareva@yandex.ru

Уважаемые рекламодатели!

На страницах журнала можно разместить рекламу о медицинских и оздоровительных организациях и учреждениях, информацию о новых лекарственных препаратах, изделиях медицинской техники, продуктах здорового питания. Приглашаем вас разместить информацию о деятельности вашего учреждения на страницах журнала в виде научной статьи, доклада или в форме рекламы.

Тарифы на размещение рекламного материала

Площадь на полосе	Черно-белая печать, руб.	Полноцветная печать, руб.
1/1 210 × 280 мм (A4)	4000	10000
1/2	2500	7500
1/4	1500	5000
1/8	1000	2500
1/16	800	1000
Текстовая реклама	50 руб. за 1 кв. см	

Скидки: 2 публикации — 5%, 4 публикации — 10%, 6 публикаций — 15%.