

Московцев А.А.^{1,2}, Клементьева Т.С.¹, Зайченко Д.М.¹,
Колесов Д.В.¹, Соколовская А.А.¹, Кубатиев А.А.^{1,2}

Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, г. Москва, Россия, ул. Балтийская, д. 8

² ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия, ул. Баррикадная, д. 2/1, стр. 1

Нарушения фолдинга белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) являются причиной развития особой формы протеотоксического клеточного стресса — стресса ЭПР. При этом незрелые и неправильно свернутые белки накапливаются в просвете ЭПР и образуют цитотоксичные агрегаты. При стрессе ЭПР в клетке запускается неспецифический защитный механизм — система сигнальных каскадов ответа на белки с нарушенными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR). Важным элементом UPR является сигнальный путь, опосредуемый трансмембранным белком ЭПР IRE1, эндорибонуклеазный домен которого при активации вырезает интрон в мРНК ХВР1, что приводит к синтезу транскрипционного фактора sXBP1, индуцирующего экспрессию целого ряда проадаптивных генов. Кроме цитопротекторной функции, IRE1 является ключевым регулятором ЭПР-стресс-индуцированной клеточной гибели. Предполагается, что при продолжительной активации IRE1 переключается с проадаптивной на проапоптотическую регуляцию. **Цель.** Исследование зависимости выживаемости клеток от длительности активности сигнального пути, опосредуемого рибонуклеазной активностью IRE1, при стрессе эндоплазматического ретикулума. **Методика.** С применением RT-qPCR, ингибирования эндорибонуклеазного домена IRE1 α соединением STF-083010 проведен анализ зависимости выживаемости клеток от периода активности IRE1 α при стрессе ЭПР различной интенсивности. **Результаты.** Установлено, IRE1 α оказывает преимущественно цитопротекторное действие при интенсивном стрессе — ингибирование соединением STF-083010 снижает жизнеспособность клеток. Характер зависимости выживаемости клеток от периода активности IRE1 α при стрессе ЭПР клеточноспецифичен: выживаемость несекретирующих T-лимфоцитов Jurkat была выше при ингибировании IRE1 α на ранних сроках интенсивного стресса, нежели на поздних; для секретирующих эндотелиоцитоподобных клеток EA.hy926 наблюдалось обратное отношение.

Ключевые слова: клеточный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума, Ire1, адаптация, апоптоз.

Для цитирования: Московцев А.А., Клементьева Т.С., Зайченко Д.М., Колесов Д.В., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Проадаптивная и проапоптотическая активности стресс-активируемой рибонуклеазы IRE1: разделение на временной шкале клеточного стресса. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(4): 21—27.

DOI:

Для корреспонденции: Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции агрегатного состояния крови, ФГБНУ НИИОПП, e-mail: bioinf@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, номер проекта 18-34-00950 мол_а

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2018

Moskovtsev A.A.^{1,2}, Klementyeva T.S.¹, Zaychenko D.M.¹,
Kolesov D.V.¹, Sokolovskaya A.A.¹, Kubatiev A.A.^{1,2}

Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival

¹ FSBSI Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russia

² Russian Medical Academy of Postdoctoral Education, Moscow, Russia

Protein unfolding in the endoplasmic reticulum (ER) induces a particular form of proteotoxic cellular stress — ER stress: immature and incorrectly folded proteins can accumulate in the ER lumen and form cytotoxic aggregates. Under ER stress, the non-specific protective mechanism, Unfolded Protein Response (UPR), is activated. The key element of UPR is the signaling pathway mediated by transmembrane ER protein IRE1. The activated endoribonuclease domain IRE1 α

causes non-canonic XBP1 mRNA splicing, which leads to the synthesis of an active transcription factor sXBP1. It induces the expression of proadaptive genes. In addition to its cytoprotective function, IRE1 is also a key regulator of ER stress-induced cell death. It is assumed that with prolonged activation, IRE1 switches from proadaptive to proapoptotic regulation. **Aim.** This paper is devoted to studying possible IRE1 α switching from proadaptive to proapoptotic regulation. Using the inhibition of the IRE1 α endoribonuclease domain by the compound STF-083010, we analyzed the dependence of cell survival on the period of IRE1 α activity under ER stress of varying intensity. We observed the cell specificity of this dependence: in non-secreting Jurkat cells, inhibition of IRE1 α in the early stages of intense stress was less toxic than in the later ones; in secreting EA.hy926 cells, an inverse relationship was observed. **Purpose of the study.** The study of the dependence of cell survival on the duration of the activity of the signaling pathway, mediated by the ribonuclease activity of IRE1, during endoplasmic reticulum stress. **Methods.** Using RT-qPCR, inhibition of the IRE1 α endoribonuclease domain by compound STF-083010, the dependence of cell survival on the period of IRE1 α activity during ER stress of various intensities was analyzed. **Results.** IRE1 α exerts a predominantly cytoprotective effect under intense stress — inhibition by the compound STF-083010 reduces cell viability. The character of the dependence of cell survival on the period of IRE1 α activity under ER stress is cell-specific: the survival of non-secretive T-lymphoblasts Jurkat was higher when IRE1 α was inhibited in the early stages of intense stress than in the latter; for secreting endotheliocyte-like cells EA.hy926, an inverse relationship was observed.

Keywords: cell stress, ER stress, Ire1, adaptation, apoptosis.

For citation: Moskovtsev A.A., Klementyeva T.S., Zaychenko D.M., Kolesov D.V., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A. Time-restricted IRE1 activity: impact on cell survival. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(4): 21—27. (in Russian).

DOI:

For correspondence: Aleksey A. Moskovtsev, PhD, Leading Researcher, Federal State Budgetary Scientific Institution «General Pathology and Pathophysiology»; 8, Baltiyskaya st., Moscow, 125315, Russian Federation, e-mail: bioinf@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. This work has been supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR grant № 18-34-00950 mol_a)

Information about authors:

Kubatiev A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>

Received 11.10.2018

Введение

В функционировании организма как многоклеточного ансамбля фундаментальную роль играют внеклеточные белки, проходящие при созревании через так называемый секреторный путь клетки и, в первую очередь, через эндоплазматический ретикулум (ЭПР). Нарушения фолдинга белков в ЭПР могут стать причиной развития особой формы протеотоксического клеточного стресса — стресса ЭПР [1]: незрелые и неверно свернутые белки могут накапливаться в просвете ЭПР, образовывать цитотоксичные агрегаты и приобретать иммуногенность. Концентрация дефектных белков в люмене ЭПР может возрастать в условиях дефицита питательных веществ, гипоксии, при действии токсических и мутагенных веществ, а также по множеству других причин.

При стрессе ЭПР активируется неспецифический защитный механизм — система сигнальных каскадов ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR) [2—4]. Ранним результатом активации UPR является запуск адаптивных процессов в клетке, таких, как синтез элементов сис-

темы фолдинга, рост деградации белков (ERAD), увеличение размеров ЭПР-компартамента, аутофагия и ряд других [5, 6]. Однако UPR может выступать и как индуктор клеточной гибели [7].

Важным элементом системы UPR является трансмембранный белок 1-го типа ЭПР IRE1 [8]. Наиболее широко представленная в клетках человека изоформа IRE1 α — мультидоменный белок, участвующий в нескольких внутриклеточных сигнальных системах. При стрессе ЭПР IRE1 α активируется, при этом происходит трансавтофосфорилирование киназного домена IRE1 α , что, в свою очередь, активирует РНКазный домен IRE1 α [9]. Эндорибонуклеазная активность IRE1 α проявляется как минимум по двум направлениям, однако перечень субстратов IRE1 α до конца не установлен. IRE1 α участвует в сплайсинге мРНК гена XBP1, который реализуется по неклассическому пути в цитоплазме, а, именно IRE1 α вырезает 26-нуклеотидный интрон [5]. Транслированный со сплайсированной мРНК XBP1 белок sXBP1 перемещается в ядро и активирует транскрипцию шаперонов ЭПР и генов, вовлеченных

в деградацию белка. Второй процесс, происходящий с участием рибонуклеазного домена IRE1 α , — IRE1 α -зависимая деградация мРНК, ассоциированных с ЭПР (RIDD) [10] — представляет собой XBP1-независимый посттранскрипционный механизм контроля ферментом IRE1 α экспрессии генов в стрессированных клетках.

Активация IRE1 α при стрессе ЭПР носит временный характер — даже в условиях сохранения стресс-индуцирующего стимула наблюдается снижение, аттенуация эндорибонуклеазной активности [7, 11]. Предполагается, что начальная активация IRE1 α прежде всего выполняет цитопротективную функцию [12]. Однако ряд данных указывает на то, что IRE1 α может также быть регулятором проапоптотических сигнальных каскадов [7]. В частности, цитозольный домен IRE1 α связывает адапторный белок TNFR-associated factor 2 (TRAF2), что активирует киназу Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) и ее мишень — киназу cJun-N terminal kinase (JNK) [13]. Активация JNK является важным проапоптотическим событием, которое, таким образом, оказывается связанным с активацией IRE1 α [14]. Однако по-прежнему недостаточно ясно, как реализуется двойственная (цитопротективная и проапоптотическая) функция эндорибонуклеазного домена IRE1 α при стрессе ЭПР.

Возможным путем решения указанной проблемы регуляторного дуализма IRE1 α и UPR в целом может быть рассмотрение эндорибонуклеазной активности IRE1 α в динамике. Цель исследования — проверка предположения, что продолжительность активности IRE1 α в клетках влияет на выживаемость клеток при стрессе ЭПР. Для этого нами был применен подход по снижению активности IRE1 α с помощью специфического ингибитора IRE1 α в определенных временных точках на фоне индукции стресса ЭПР в линиях клеток Jurkat и EA.hy926 — клеточных типах, различающихся по ядерно-цитоплазматическому отношению и степени развития секреторного пути.

Методика

Клеточные линии. Исследования выполнены на линиях клеток Jurkat (Т-клеточный лимфобластоидный лейкоз человека) [15], полученных из Российской коллекции культур клеток позвоночных, и EA.hy926 (гибрид первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC и тиогуанин-резистивного клона линии клеток аденокарциномы легкого A549). Клетки EA.hy926 были любезно предоставлены доктором Edgel C.J. (Университет Северной Каролины, США).

Инкубация клеток с тапсигаргином, ингибирование IRE1 α . Клетки Jurkat культивировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ТЭС) в атмосфере с 5% содержанием CO₂ при 37С, клетки EA.hy926 — в питательной среде DMEM (4,5г/л глюкозы) с добавлением 10% ТЭС, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамина, 1% NEAA и добавки НАТ в атмосфере с 5% содержанием CO₂ при 37С. Для индукции стресса ЭПР использовался тапсигаргин (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), для ингибирования IRE1 α — IRE1 α inhibitor I, STF-083010 (Calbiochem-EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Германия). Тапсигаргин и соединение STF-083010 растворяли в ДМСО, концентрация стоковых растворов при этом подбирались так, чтобы конечная концентрация ДМСО не превышала 0,1%.

Анализ экспрессии генов. Количественная оценка изменения экспрессии мРНК проводилась методом полимеразной цепной реакции «в реальном времени» (RT-qPCR), с использованием набора реактивов Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix («Fermentas», Литва), включающим интеркалирующий краситель SybrGreen, на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Тотальную РНК выделяли с использованием набора реагентов RNeasy® Mini Kit («Qiagen GmbH», Германия) с последующей обработкой ДНКазой I и оценкой качества. Реакцию синтеза первой цепи комплементарной ДНК проводили на суммарной РНК, нормализованной флуориметрически по количеству (Qubit, «Invitrogen», США), с использованием рендом-праймеров и обратной транскриптазы M-MuLV (набор RevertAid HMinus First Strand cDNA Synthesis Kit («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом производителя. Расчет уровня матричной РНК (мРНК) проводили с использованием алгоритма $\Delta\Delta C_t$, в основу которого положены относительные изменения пороговых циклов (C_t) исследуемого и референсного гена в опытных и контрольных образцах.

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность соединений и влияние на метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста. Для этого клетки инкубировали с веществами в различных концентрациях в 96-луночном планшете. После инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий). Раствор МТТ (2,5 мг/мл в PBS) стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. После инкубации с МТТ в течение 4 ч при 37С в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и вращали планшеты на орбитальном шейкере при комнатной

температуре в течение 20 мин, до полного растворения кристаллов формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм с помощью фотометра Hidex Chameleon (Hidex Oу, Финляндия).

Статистическая обработка данных. Для обработки результатов использовали критерий Манна—Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

1. *Динамика активности эндорибонуклеазы IRE1 α при стрессе ЭПР.* Нами методом RT-qPCR был проанализирован уровень сплайсинговой формы мРНК гена XBP1 при действии 10 нМ тапсигаргина в нескольких временных точках в клетках линий Jurkat и EA.hy926. Так как несплайсированная форма мРНК XBP1 — XBP1(U) — является субстратом для эндорибонуклеазы IRE1 α , временной профиль XBP1(S) дает представление о динамике активности IRE1 α в стрессированных клетках. Для анализа профиля нами была выбрана концентрация 10 нМ тапсигаргина, которая вызывает ~50% гибель клеток обеих линий при 24-часовом воздействии (IC₄₅²⁴ для EA.hy926 и IC₅₀²⁴ для Jurkat).

Как видно из приведенных диаграмм на рис. 1, активность IRE1 α достигает максимума в линии клеток EA.hy926 спустя 4 ч после начала инкубации с индуктором стресса. Развитие стресса ЭПР в клетках Jurkat характеризуется более поздним пиком активности IRE1 α (6 ч). Из графиков также видно, что амплитуда пика XBP1(S) для клеток линии EA.hy926 выше.

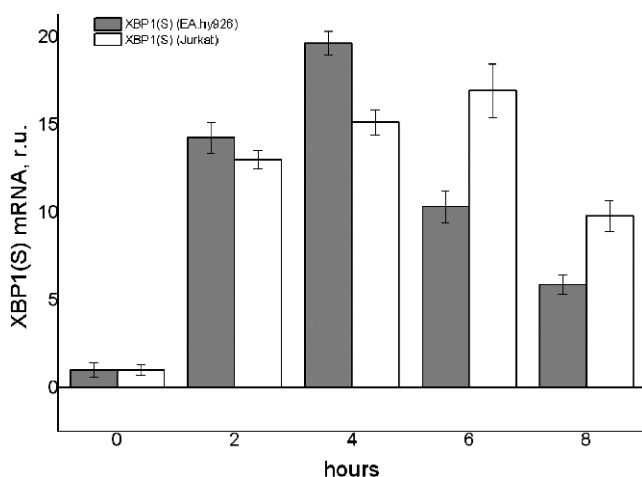


Рис. 1. Временные профили сплайсированной формы мРНК XBP1(S) в клетках EA.hy926 и Jurkat при действии 10нМ тапсигаргина — уровни экспрессии мРНК XBP1(S), измеренные методом RT-qPCR во временных точках 0, 2, 4, 6 и 8 ч после начала действия тапсигаргина. Данные представлены как средние значения \pm SD в условных единицах (r.u.).

литуда пика XBP1(S) для клеток линии EA.hy926 выше. Таким образом, максимумы эндорибонуклеазной активности IRE1 α , направленной на сплайсинг XBP1, находятся во временном интервале 4—6 ч для клеток обоих типов.

2. *Выживаемость клеток линий EA.hy926 и Jurkat при стрессе ЭПР, индуцированном тапсигаргином, на фоне действия ингибитора I IRE1 α .* Для изменения продолжительности рибонуклеазной активности IRE1 α при стрессе ЭПР, нами был применен ее ингибитор I (STF-083010) в концентрации 60 мкМ во временных точках 2 ч, 4 ч, 6 ч от начала действия индуктора тапсигаргина. Таким образом, в использованной нами экспериментальной схеме ингибитор снижает активность IRE1 α на всем протяжении действия индуктора стресса (24 ч), за исключением периодов 2 ч, 4 ч или 6 ч от начала стресса. При этом контрольные клетки подвергались действию индуктора стресса ЭПР — тапсигаргина — в соответствующих концентрациях с добавлением в точках 2 ч, 4 ч, 6 ч растворителя — ДМСО. Ингибитор IRE1 α I (STF-083010) представляет собой низкомолекулярное соединение, которое способно проникать через клеточную мембрану нативной клетки и ковалентно связываться с активным центром эндорибонуклеазы IRE1 α , блокируя ее активность. Ранее нами было показано, что STF-083010 в концентрации 60 мкМ вызывает снижение уровня сплайсированной формы XBP1(S) мРНК до 50% и более от контрольного в клетках EA.hy926 и Jurkat при стрессе ЭПР, индуцируемом 2,5 мМ дитиотрейтолом.

3. Как видно из контрольных экспериментов (клетки+индуктор ЭПР стресса, рис. 2), тапсигаргин приводит к росту клеточной гибели с близким для двух линий IC₅₀²⁴, находящемся в диапазоне 1—10 нМ. Интересно отметить стимулирующее действие (гормезис-эффект) малой концентрации тапсигаргина (1 нМ) на клетки линии EA.hy926, при этом клетки Jurkat оказались нечувствительными к данной концентрации индуктора.

При увеличении концентрации тапсигаргина выше 1 нМ действие STF-083010 приводит к более выраженной гибели клеток EA.hy926 по сравнению с контролем (только индуктор) (рис. 3, а). В условиях интенсивного стресса ЭПР (гибель клеток >50%), вызванного 100 нМ тапсигаргина, внесение ингибитора спустя 2 ч после начала стресса приводит к ожидаемо большему токсическому эффекту, нежели внесение в точке 6 ч. При этом, как следует из рис. 3, а — точка «0», собственная токсичность STF-083010 на временном интервале 18 ч (24 ч за исключением начального 6 ч периода), незначительна — более того, при 22-часовой инкубации

с STF-083010 без добавления тапсигаргина наблюдается стимулирующий эффект. Таким образом, при использовании данной экспериментальной схемы сокращение периода активности IRE1 α не приводит к росту жизнеспособности EA.hy926, т. е. при сильном стрессе IRE1 α демонстрирует на этой клеточной линии преимущественно цитопротекторную функцию.

Интересно, что на фоне действия индуктора стресса в минимальной используемой концентрации (1 нМ) на клетках EA.hy926 ингибирование IRE1 α приводило к обратному эффекту. А именно, была обнаружена обратная зависимость выживаемости клеток от времени добавления ингибитора: для точки 6 ч выживаемость клеток оказывалась статистически значимо ниже, а максимальная жизнеспособность соответствовала ранней временной точке добавления ингибитора (2 ч). Однако такое соотношение, по-видимому, обусловлено наложением стимулирующего действия ингибитора, которое проявляется и в отсутствие индуктора (точка «0»).

Хотя на линии Jurkat и были зарегистрированы похожие элементы ответов, например, стимулирование клеток соединением STF-083010 при отсутствии индуктора, в целом, соотношения между кривыми имели более сложный характер (рис. 3, б). В частности, во всех случаях сильного стресса наименее токсичным оказывалось раннее ингибирование IRE1 α на 2 ч. При слабом стрессе применение ингибитора IRE1 α повышает чувствительность клеток Jurkat к тапсигаргину.

Как было отмечено выше, эндорибонуклеазная активность IRE1 α обуславливает 2 процесса в клетках высших эукариот: сплайсинг XBP1 и процесс RIDD. Первый имеет отчетливую цитопротекторную функцию, повышая адаптивные свойства клетки. Процесс RIDD может приводить к деградации мРНК секретрируемых белков, что снижает нагрузку на ЭПР и также может иметь цитопротективный эффект. Однако в ходе RIDD могут быть расщеплены мРНК белков, необходимых для клеточного роста и выживания, что может иметь обратный эффект, т.е. способствовать клеточной гибели [16].

Рибонуклеазная активность IRE1 α является одной из основополагающих в эволюции UPR, и механизм RIDD может представлять собой эволюционно более древний способ поддержания гомеостаза ЭПР [17] по сравнению с IRE1 α -XBP1 путем — это предположение было сделано на основе того, что у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* присутствует исключительно RIDD-активность IRE1 α — в этих клетках не обнаружены HAC1/XBP1 ортологи и, таким образом, UPR не приводит к активации транскрипции [17].

Сравнительно недавно появились указания на то, что ряд прекурсоров микроРНК может быть дегра-

дирован эндорибонуклеазой IRE1 α , причем процессинг осуществляется по сайтам, отличным от сайтов действия рибонуклеазы III DICER. Было показано, что IRE1 α -опосредуемая супрессия микроРНК miR-17 приводит к увеличению экспрессии белка, взаимодействующего с тиоредоксином TXNIP, который, в свою очередь, вызывает активацию прокаспазы-1, что имеет проапоптотический эффект [18]. Кроме того, IRE1 α посредством расщепления предшественников ингибирует биогенез miR-17, miR-34a, miR-96, и miR-125b-данные микроРНК имеют сайты связывания в 3'-UTR каспазы-2, что увеличивает уровень каспазы-2 и способствует клеточной гибели [19]. Следует отметить, что нами ранее было обнаружено глобальное снижение уровня микроРНК в клетках Jurkat при стрессе ЭПР [20].

При стрессе ЭПР клетка решает противоположные задачи: с одной стороны, должна снижаться белоксинтезирующая и фолдинговая нагрузка на ЭПР, с другой стороны, необходимо активно транскрибиро-

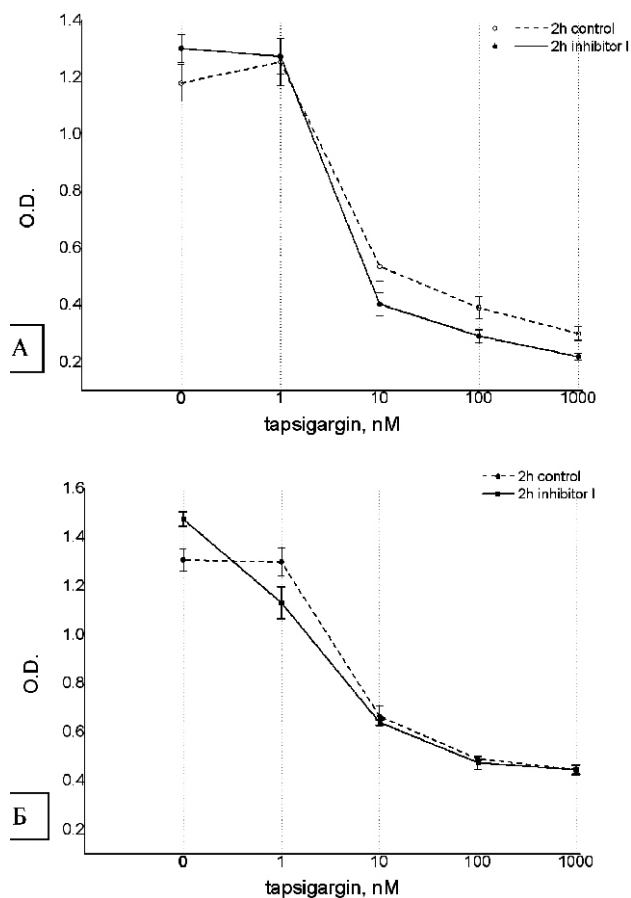


Рис. 2. Примеры кривых 24-часовой цитотоксичности тапсигаргина, тапсигаргина в комбинации с ингибитором I IRE1 α в концентрации 60 мкМ на линиях клеток EA.hy926 (А) и Jurkat (Б). На представленных примерах ингибитор I IRE1 α был добавлен спустя 2 ч после добавления тапсигаргина. Данные представлены как средние значения \pm SD.

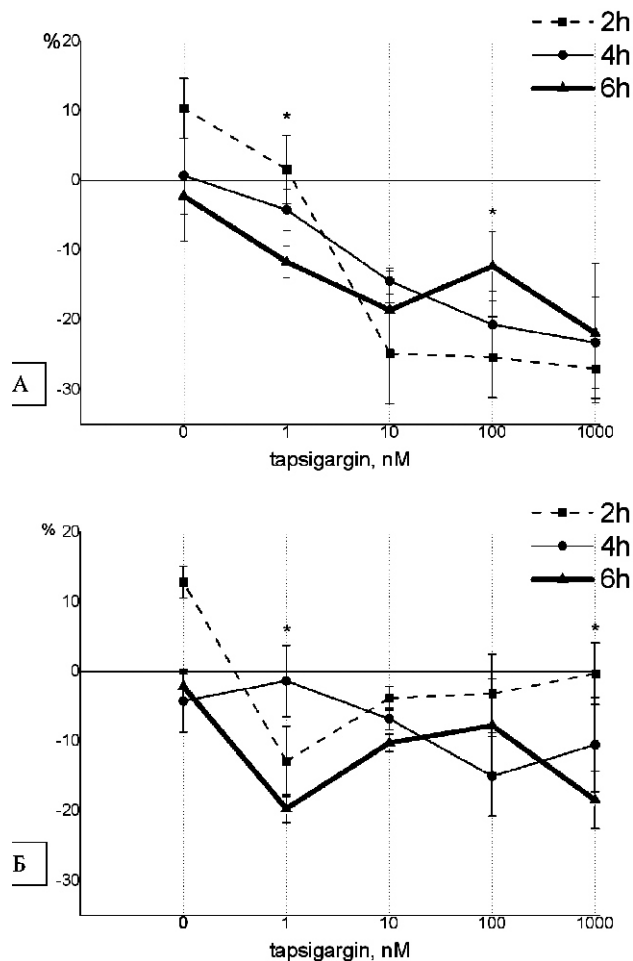


Рис. 3. Кривые, отражающие влияние ингибитора IRE1 α на жизнеспособность клеток EA.hy926 (А) и Jurkat (Б) при 24-часовом действии тапсигаргина в диапазоне концентраций 1–1000 нМ. Значения жизнеспособности клеток представлены в % и нормированы на контроль. Положительные значения означают увеличение жизнеспособности клеток в данной точке на указанную на графике величину, отрицательные — снижение. На каждой диаграмме представлены 3 кривые, отражающие изменение жизнеспособности клеток при внесении ингибитора IRE1 α спустя 2, 4 и 6 ч после начала стресса. Данные представлены как средние значения \pm SD. * — p-val < 0,05.

вать и синтезировать шапероны и прочие факторы, способствующие клеточной адаптации. Т.е., в какой-то степени оба эти адаптационные механизма являются взаимосключающими. Возможно, что регуляторный дуализм IRE1 α может реализовываться через механизм разделения ее функций во времени, а именно, через последовательное расщепление субстратов:

- высокоспецифичный сплайсинг ХВР1 с цитопротективным эффектом (краткосрочная активация IRE1 α);
- расщепление мРНК-субстратов RIDD с цитопротективным действием (краткосрочная активация IRE1 α);

- расщепление мРНК-субстратов RIDD с апоптоз-индуцирующим действием (продолжительная активация IRE1 α).

Исученная нами зависимость выживания клеток от времени ингибирования IRE1 α указывает на особенности реализации опосредуемого IRE1 α стрессового сигнального пути в зависимости от клеточного типа. При интенсивном стрессе раннее снижение активности IRE1 α в клетках EA.hy926 оказывает наибольший цитотоксический эффект по сравнению с более поздним ингибированием, что указывает на преимущественно цитопротективную функцию IRE1 α . В клетках Jurkat мы видим обратное отношение — раннее снижение активности IRE1 α оказывается наименее токсичным. Клетки EA.hy926 являются адгезивными, имеют развитый ЭПР и синтезируют значительное количество белков на экспорт. В отличие от EA.hy926, для Т-лимфобластов Jurkat характерен суспензионный тип роста, их ядерно-цитоплазматическое отношение велико, ЭПР развит слабо, так как клетки не являются секреторными. Возможно, что дисфункция ЭПР может иметь меньшие последствия для клеток Jurkat при условии ограничения проапоптотических сигналов от IRE1 α — действительно, раннее (2ч) снижение активности IRE1 α почти не влияет на выживаемость клеток при интенсивном стрессе ЭПР. Более токсичным оказывается для этих клеток ингибирование на поздних стадиях стресса, на которых может ярче проявляться проапоптотическая составляющая сигнальной активности IRE1 α . На кривые токсичности и их соотношение на фоне ингибирования IRE1 могут оказывать влияние сдвиги во времени максимумов активации IRE1 при различных концентрациях тапсигаргина.

Таким образом, в ходе исследования нами были обнаружены клеточно-специфические особенности характера зависимости выживаемости клеток от продолжительности активности IRE1 α при стрессе ЭПР.

Литература (п.п. 1; 3—20 см. References)

2. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Молекулярная логика сигнальных путей при стрессе эндоплазматического ретикулума система: UPR (Unfolded Protein Response). 2013; 4: 97-108.

References

1. Kozutsumi, Y.; Segal, M.; Normington, K.; Gettling, M.-J.; Sambrook, J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 1988, 332, 462.
 2. Mesitov, M.; Moskovtsev, A.; Kubatiev, A. Molecular logic of the endoplasmic reticulum stress signal pathways: the system of unfolded protein response. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* 2013; 4: 97-108. (in Russian)

3. Ron, D.; Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, 8, 519-29.
4. Gardner, B.M.; Pincus, D.; Gotthardt, K.; Gallagher, C.M.; Walter, P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013, 5, a013169.
5. Schroder, M.; Kaufman, R.J. The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 2005, 74, 739-89.
6. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011, 334, 1081-6.
7. Lin, J.H.; Li, H.; Yasumura, D.; Cohen, H.R.; Zhang, C.; Panning, B.; Shokat, K.M.; LaVail, M.M.; Walter, P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007, 318, 944-9.
8. Sidrauski, C.; Walter, P. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 1997, 90, 1031-9.
9. Korennykh, A.; Walter, P. Structural basis of the unfolded protein response. *Annual review of cell and developmental biology* 2012, 28, 251-77.
10. Hollien, J.; Lin, J.H.; Li, H.; Stevens, N.; Walter, P.; Weissman, J.S. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 2009, 186, 323-31.
11. Li, H.; Korennykh, A.V.; Behrman, S.L.; Walter, P. Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, 107, 16113-8.
12. Sano, R.; Reed, J.C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2013, 1833, 3460-70.
13. Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H.P.; Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000, 287, 664-6.
14. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 2012, 13, 89-102.
15. Schneider, U.; Schwenk, H.-U.; Bornkamm, G. Characterization of EBV-genome negative «null» and «T» cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International journal of cancer* 1977, 19, 621-6.
16. Maurel, M.; Chevet, E.; Tavernier, J.; Gerlo, S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences* 2014, 39, 245-54.
17. Kimmig, P.; Diaz, M.; Zheng, J.; Williams, C.C.; Lang, A.; Aragyn, T.; Li, H.; Walter, P. The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *Elife* 2012, 1.
18. Lerner, A.G.; Upton, J.-P.; Praveen, P.; Ghosh, R.; Nakagawa, Y.; Igarria, A.; Shen, S.; Nguyen, V.; Backes, B.J.; Heiman, M.; others IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell metabolism* 2012, 16, 250-64.
19. Upton, J.-P.; Wang, L.; Han, D.; Wang, E.S.; Huskey, N.E.; Lim, L.; Truitt, M.; McManus, M.T.; Ruggero, D.; Goga, A.; others IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* 2012, 338, 818-22.
20. Mesitov, M.V.; Soldatov, R.A.; Zaichenko, D.M.; Malakho, S.G.; Klementyeva, T.S.; Sokolovskaya, A.A.; Kubatiev, A.A.; Mironov, A.A.; Moskovtsev, A.A. Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Scientific reports* 2017, 7, 46080.

Сведения об авторах:

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, доцент каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, e-mail: bioinf@mail.ru;

Клементьева Татьяна Сергеевна, аспирантка ФГБНУ НИИОПП;

Зайченко Данила Михайлович, мл. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: danilamihailovich@mail.ru;

Колесов Дмитрий Валерьевич, науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП, e-mail: maedros@bk.ru;

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. ФГБНУ НИИОПП;

Кубатиев Аслан Амирханович, доктор мед. наук, акад. РАН, руководитель отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП; зав. каф. общей патологии и патофизиологии ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.