

М.В. Меситов, Т.И. Игнашкова, М.Е. Мещерский,
А.С. Акопов, А.А. Соколовская, А.А. Московцев, А.А. Кубатиев

Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Стресс ЭПР — типовой молекулярно-патофизиологический процесс, лежащий в основе многих сердечно-сосудистых, эндокринных и других заболеваний. Нарушения процессов конформационного созревания белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) могут индуцировать протеотоксический стресс. Активированные компенсаторные механизмы в ответ на нарушение фолдинга белков в ЭПР включают в себя рост экспрессии ферментов, участвующих в образовании дисульфидных связей в белках. Продуктом окисления сульфгидрильных групп белков являются активные формы кислорода (АФК). Увеличение активности оксидоредуктазы ERO1 может быть одним из механизмов развития окислительного стресса — однако, источник АФК при стрессе ЭПР и связь гиперпродукции АФК со стрессом ЭПР остаются предметом дискуссий. В данном исследовании показано, что индуцируемое дитиотрейтолом (ДТТ) нарушение окислительно-восстановительного баланса, сопровождаемое падением продукции АФК, приводит к развитию стресса эндоплазматического ретикулума в клетках Jurkat. Стресс ЭПР в этих клетках не ассоциирован с повышением продукции АФК, воздействие ДТТ приводит к индукции апоптоза. Гомоцистеин, индуцирующий в эндотелиоцитах стресс ЭПР, для Jurkat не является эффективным индуктором стресса ЭПР в исследованном диапазоне концентраций. Таким образом, при ДТТ-индуцированном стрессе ЭПР в клетках Jurkat продукция АФК не повышена, однако, для других типов клеток генерация АФК при стрессе ЭПР может являться в определенной степени адаптивным процессом с учетом возможного участия АФК в образовании дисульфидных связей белков протеома, включая белки в эндоплазматическом ретикулуме.

Ключевые слова: стресс эндоплазматического ретикулума, дитиотрейтол, активные формы кислорода, фолдинг белков, оксидоредуктаза ERO1, дисульфидные связи белков

M.V. Mesitov, T.I. Ignashkova, M.E. Mesherkiy, A.S. Akopov,
A.A. Sokolovskaya, A.A. Moskovtsev, A.A. Kubatiev

Redox imbalance with low ros production is associated with er stress in Jurkat cells

The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS, 8, Baltiyskaya str., 125315, Moscow, Russia

Endoplasmic reticulum stress — typical molecular pathophysiological process that underlies many cardiovascular, endocrine and other diseases. Violations of the protein conformational maturation processes in the endoplasmic reticulum can cause proteotoxic stress. Compensatory mechanisms are activated in response to ER stress include increased expression of enzymes involved in the formation of disulfide bonds in proteins. The sulfhydryl groups oxidation in the electron transport chain (PDI-ERO1-O₂) is associated with reactive oxygen species (ROS) generation. Increased activity of oxidoreductase ERO1 could be one of the mechanisms of oxidative stress — however, a direct relationship of ER stress with the overproduction of ROS remains a subject of debate. In this study we have shown that induced by dithiothreitol (DTT) violation of the redox balance with low ROS production leads to the endoplasmic reticulum stress in Jurkat cells. ER-stress in these cells is not associated with increased ROS production, DTT treatment leads to induction of apoptosis. Modulation of intracellular levels of ROS can influence the apoptosis-inducing effects of ER-stress. Given the possible involvement of ROS in the generation of disulfide bonds, the role of ROS in ER stress may be a modulation of disulfide proteome including client proteins.

Key words: endoplasmic reticulum stress, dithiothreitol, reactive oxygen species, proteins folding, oxidoreductase ERO1, disulfide bonds in proteins

Для корреспонденции: Меситов Михаил Валентинович, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболитизиса ФГБУ НИИОПТ РАМН. E-mail: geliopolit@yandex.ru

Около 30% белков эукариот, в том числе большинство секреторных, синтезируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикула (ЭПР) и приобретает нативную конформацию в люмене эндоплазматического ретикула [2]. «Качество» белковых конформаций контролируется системой ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control).

Одной из особенностей ассоциированного с трансляцией (котрансляционного) фолдинга белков в ЭПР является образование дисульфидных связей. Доминирующим у эукариот механизмом формирования дисульфидных связей в белках является совместное действие ферментов семейства протеиндисульфоизомераз (PDI), осуществляющих окисление сульфгидрильных групп, изомеризацию, восстановление дисульфидных связей b оксидоредуктаз Ero-1 (тканеспецифичные изоформы Ero-1- α и Ero-1- β у человека), окисляющих протеиндисульфоизомеразы.

Молекулярный кислород в аэробных условиях является конечным акцептором электронов, полученных ферментами PDI и переданных Ero-1 у эукариот [13,14]. Формируемая таким образом цепь переноса электронов является ключевым элементом системы окислительного фолдинга [10]. Считается, что процесс образования дисульфидных связей влечет за собой существенную генерацию АФК — вплоть до 25% от общего количества АФК, продуцируемого клеткой [8].

Нарушения процессов конформационного созревания белков могут стать причиной развития протеотоксического стресса, динамика которого определяется интенсивностью *de novo* синтеза и обновления клеточных и экстраклеточных белков. Продукты незаконченной трансляции, интермедиаты фолдинга с некорректной конформацией, а также субъединицы, не включенные в олигомерные белковые комплексы, могут экспонировать гидрофобные области [6], которые становятся дополнительными, «незаконными» интерфейсами для межмолекулярного взаимодействия и могут приводить к агрегации белков, формированию токсичных и иммуногенных продуктов. Накопление конформационно-дефектных белков в люмене ЭПР в связи со множественностью функций и единым объемом этого компартмента может инициировать дисфункции других систем ЭПР, и тем самым индуцировать общее состояние ЭПР, характеризующееся как стресс эндоплазматического ретикула.

Стресс ЭПР — типовой молекулярно-патолофизиологический процесс, лежащий в основе многих сердечно-сосудистых, эндокринных и других заболеваний. В частности, дисфункция эндотелия при гипергомоцистеинемии может быть обусловлена индуцируемым избытком гомоцистеина стрессом ЭПР и IRE1-зависимым апоптозом [16]. Нарушения конформационного созревания белков, ЭПР-стресс и окислительный стресс играют важную роль в патогенезе

незе нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона [8].

Для защиты от протеотоксического стресса и ошибок работы системы конформационного созревания белков в ЭПР эукариот возникли следующие приспособления:

- рецепция белков с нарушенными конформациями в эндоплазматическом ретикуле;
- обработка и передача информации в ядро о детектированных белках с дефектными или незрелыми конформациями;
- адаптационные изменения ЭПР и ассоциированных структур, общим результатом действия которых должно стать снижение концентрации дефектных белков в люмене ЭПР.

Перечисленные функции реализуются посредством нескольких механизмов, действующих зачастую совместно:

- система сигнальных каскадов ответа на белки с ненативными конформациями (Unfolded Protein Response, UPR);
- контроль трансляции — аттенуация кэп-зависимой трансляции, опосредуемая киназой PERK;
- активация транскрипционного фактора ATF6;
- ответ на избыток белка в люмене ЭПР, или «перегрузку» ЭПР (endoplasmic reticulum overload response, EROR), опосредуемый активированным транскрипционным фактором NF- κ B.

Активированные компенсаторные механизмы в ответ на нарушение фолдинга белков в люмене ЭПР включают в себя рост экспрессии ферментов, участвующих в образовании дисульфидных связей в белках. Увеличение активности оксидоредуктазы Ero1 может приводить к росту продукции АФК [13]. Считается, что это может быть одним из механизмов развития окислительного стресса — однако, источник АФК при стрессе ЭПР и связь гиперпродукции АФК со стрессом ЭПР остается предметом дискуссий.

На фоне большого количества исследований, посвященных стрессу ЭПР в профессиональных секреторных клетках, значительно меньшее внимание уделяется клеткам, не синтезирующим значительное количество белка на экспорт. Цель работы — исследование особенностей течения стресса эндоплазматического ретикула и ассоциации его с генерацией АФК в линии клеток Т-лимфобластной лейкемии Jurkat.

Методика

Культивирование клеток

Суспензионные клетки Jurkat культивировали на среде RPMI1640 (Gibco, Invitrogen Corporation) с 10% FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO₂. Пересев производили с плотностью 5,0×10⁵ клеток/мл. Подсчет клеток производили на автоматическом счетчике клеток фирмы InvitroGen Countess.

Иммуноцитохимия

После инкубации в присутствии различных концентраций дитиотрейтола (ДТТ) и гомоцистеина, клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом, пермеабилizировали 0,01%-ным раствором Тритон X-100 и блокировали 3%-ным раствором БСА (бычьим сывороточным альбумином). Затем клетки инкубировали с первичными моноклональными антителами к белкам с пептидом KDEL (Abcam, Великобритания) и вторичными родамин-мечеными антителами (KPL, США). Визуализацию локализации проводили при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа ECLIPSE TE2000U (Nikon, Япония) с использованием программного обеспечения EZ версии 2.3.

Иммуноблоттинг

Белки разделяли электрофорезом в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, переносили на мембрану PVDF (поливинилиден дифлуорид), после чего блокировали в растворе 5% сухого молока. Инкубировали с первичными анти-KDEL антителами, приготовленными в разведении 1:1000, в течение 1 ч, затем со вторичными козыми анти-мышинными антителами, мечеными пероксидазой хрена, разведенными 1:3000 также в течение 1 ч. Белки визуализировали на станции геле-документирования Kodak Image Station 440CF.

Детектирование активных форм кислорода

Для определения уровня продукции АФК использовали дихлорофлуоресцеиндиацетат H₂DCFDA (Invitrogen Corp.) — почти не флуоресцирующее соединение, легко проникающее через клеточную мембрану в клетку и гидролизующееся внутриклеточными эстеразами до 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCFH). Также не флуоресцирующее соединение DCFH, в свою очередь, окисляется реактивными формами кислорода до 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF) с высоким уровнем флуоресценции.

В качестве положительного контроля использовали клетки, инкубированные 30 мин с пероксидом водорода в конечной концентрации 10 мМ, отрицательного — клетки с добавленным эквивалентным объемом воды. Зонд H₂DCFDA использовался в концентрации 4 мкМ/л. Клетки с зондом инкубировали 30 мин, затем однократно отмывали PBS, после чего с помощью проточной цитометрии детектировали флуоресценцию DCF при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 535 нм.

Проточная цитометрия

Сбор и анализ данных проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с аргоновым лазером (длина волны 488 нм) с использованием программного обеспечения CELLQuest. В каждом образце анализировали не менее 10000 событий.

Результаты и обсуждение*Экспрессия белков с сигналом локализации KDEL при действии ДТТ и гомоцистеина*

Для анализа изменений в клетках Jurkat при действии индуктора ДТТ было проведено исследование экспрессии ЭПР-резидентных белков методом иммуноцитохимии с применением моноклональных антител, специфичных к пептиду KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) — сигналу локализации в ЭПР. Среди белков с сигналом KDEL в ЭПР преобладают шапероны HSPA5 (GRP78, или BiP), HSP90B1 (GRP94), белки семейства протеиндисульфоизомераз (PDI). Повышение экспрессии этих белков является элементом адаптивного каскада — ответа на белки с ненативными конформациями — UPR (Unfolded Protein Response), индукция которого ассоциирована со стрессом эндоплазматического ретикула.

С помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии клеток Jurkat, инкубированных в ростовой среде с добавлением индуктора ДТТ в течение 18 ч, было детектировано шестикратное увеличение интенсивности флуоресценции, что может свидетельствовать о повышении экспрессии KDEL-содержащих белков (рис. 1).

В предыдущих работах нами и рядом других авторов [11] показано, что избыток гомоцистеина также способен индуцировать стресс ЭПР, в частности, в эндотелиоцитах человека. Инкубация клеток Jurkat с гомоцистеином в концентрации, вызывающей стрессорный ответ в клетках HUVEC, не приводило к существенному росту экспрессии KDEL-содержащих белков у Jurkat. Проведенная оценка экспрессии методом вестернблот подтверждает детектированное методом АСКМ увеличение концентрации белков ЭПР с сигналом локализации в ЭПР при действии ДТТ. Необходимо отметить, что гетерогенность клеток Jurkat по экспрессии KDEL-белков в контроле без воздействия ниже, чем при индукции стресса. Как видно из рис. 1 В, стрессированные клетки могут существенно отличаться по экспрессии белков ЭПР, участвующих в адаптивном ответе.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об увеличении экспрессии KDEL-содержащих белков в клетках Jurkat при их инкубации в среде, содержащей 2,5 мМ/л ДТТ. С учетом уровня экспрессии указанных белков, можно говорить об умеренной индукции стресса эндоплазматического ретикула в этих клетках.

*Генерация АФК**при действии ДТТ и гомоцистеина*

Для анализа генерации АФК при стрессе эндоплазматического ретикула применяли метод проточной цитометрии с использованием зонда дихлорофлуоресцеиндиацетат.

Как видно из представленных однопараметрических гистограмм (рис. 2 А), а также графика с величинами геометрических средних по каналу FL1 (интенсивностей флуоресценции DCF) для диапазона концентраций 1,25—10,00 мМ/л, ДТТ и гомоцистеин снижали внутриклеточную концентрацию АФК по сравнению с контрольными значениями (клетками без воздействия). Для концентраций, меньших 1,25 мМ/л, ДТТ приводил к росту интенсивности флуоресценции зонда, что может свидетельствовать о повышенной генерации АФК в диапазоне концентраций 0,625—0,019 мМ/л.

Гомоцистеин также приводил к росту продукции АФК, однако его действие менее выражено и максимальный эффект достигается в диапазоне 0,625—0,156 мМ/л.

Присутствие в инкубационной среде ДТТ и гомоцистеина при загрузке зонда, по-видимому, обуславливало снижение регистрируемого содержания АФК в клетках. Проведенный анализ динамики концентрации общего гомоцистеина методом tITPCE-MS (transient capillary Isotachopheresis- Mass Spectrometry) в клетках Jurkat показал, что повышение внутриклеточной кон-

центрации гомоцистеина по сравнению с контролем детектировалось на 10-й мин после добавления гомоцистеина в среду в концентрации 2,5 мМ/л. Равновесная внутриклеточная концентрация гомоцистеина регистрировалась спустя 30 мин после начала инкубации. По данным литературы, ДТТ эффективно проникает через цитоплазматическую мембрану, и уже после нескольких минут инкубации обнаруживается его действие внутри клетки [10].

Установившееся равновесное состояние для диапазона концентраций 1,25—10,00 мМ/л и для ДТТ, и для гомоцистеина, характеризовалось сниженным содержанием внутриклеточных АФК, что может свидетельствовать об изменении окислительно-восстановительного состояния клетки. Исключение из инкубационной среды индукторов ДТТ и гомоцистеина приводило к сравнительно быстрому возвращению уровня внутриклеточного АФК к контрольным значениям (рис. 2 Е). Причиной наблюдаемого роста продукции АФК в ходе инкубации с индукторами для диапазона концентраций 0,625—0,156 мМ/л и гомоцистеина, и ДТТ, может быть действие этих соединений на дыхательную цепь переноса электронов митохондрий.

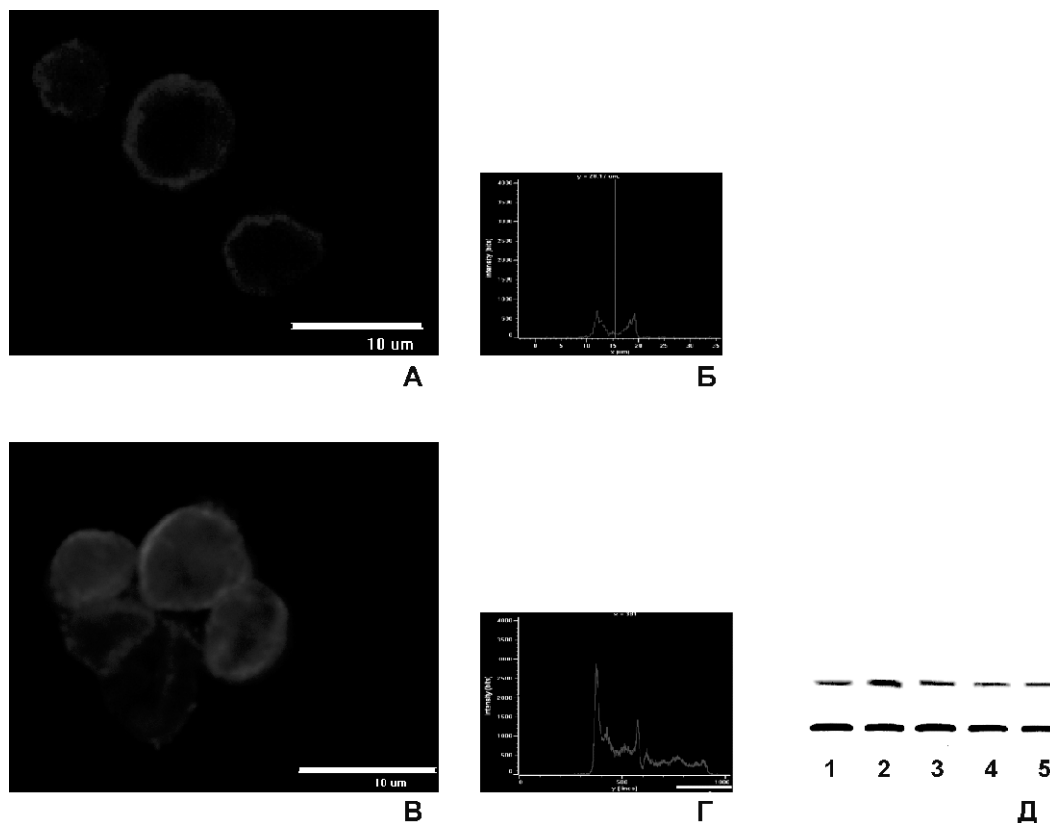


Рис. 1. Экспрессия ЭПР-резидентных белков с сигналом локализации KDEL в клетках Jurkat, инкубированных с ДТТ 18 ч:

А–Г – ЛКСМ микрофотографии и соответствующие гистограммы:

А, Б – контроль, 18 ч без воздействия; В, Г – ДТТ 2,5 мМ/л, 18 ч; Д – вестернблоттинг: 1 – ДТТ 0,31 мМ/л; 2 – ДТТ 2,5 мМ/л; 3 – гомоцистеин 0,31 мМ/л; 4 – гомоцистеин 2,5 мМ/л; 5 – контроль

Показано, что гомоцистеин модулирует продукцию АФК, предполагаемым механизмом этого является возможное образование дисульфидных связей с тиольными группами комплекса I или комплекса III [4].

Цитоплазма клеток, как известно, характеризуется более низким по сравнению с внеклеточной средой окислительно-восстановительным потенциалом — соотношение фракции восстановленного к окисленному глутатиону составляет более 10:1 [5]. Однако люмена эндоплазматического ретикулума более окислена, что создает необходимые условия для образования дисульфидных связей. Инкубация с сое-

динениями-восстановителями, в частности, ДТТ, приводит к росту их внутриклеточной концентрации, что способно нарушать окислительно-восстановительный баланс ЭПР.

В соответствии с полученными данными, индуцированный ДТТ стресс ЭПР в клетках Jurkat в интервале времени до 24 ч не сопровождается развитием окислительного стресса. Состояние редокс-дисбаланса в данном случае характеризуется сниженной концентрацией АФК и представляет собой восстановительный стресс, не ассоциированный с окислительным стрессом.

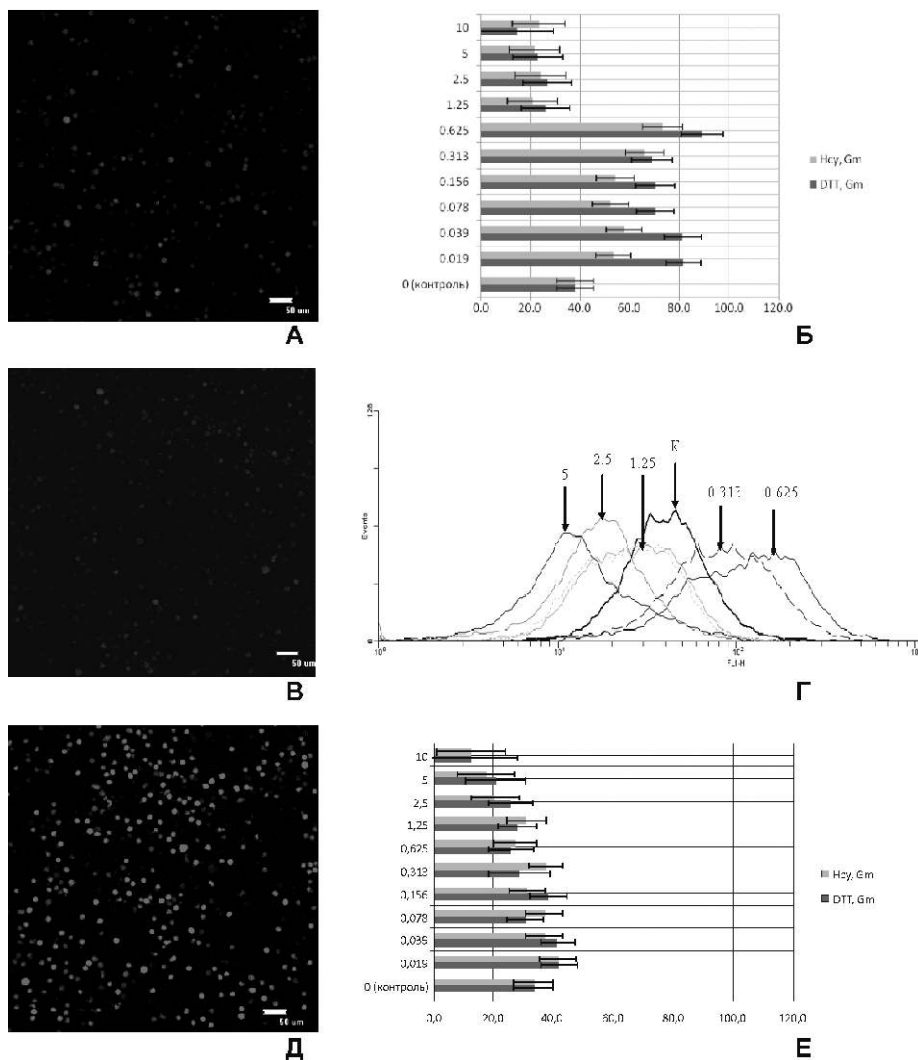


Рис. 2. Анализ генерации АФК в клетках линии Jurkat. Клетки Jurkat инкубировали в среде с ДТТ и гомоцистеином в диапазоне концентраций 0,019–10 мМ/л 24 ч, загружали зондом дихлорфлуоресцеиндиацетат и анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки содержания АФК:

А — однопараметрические гистограммы по каналу FL1 для разных концентраций ДТТ (10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; мМ/л, контроль);

Б — график зависимости геометрического среднего пика однопараметрической гистограммы от концентрации индукторов;

В–Г — конфокальные микрофотографии: В — контрольные клетки без воздействия; Г — ДТТ 2,5 мМ/л, 24 ч;

Д — индукция перекисью водорода 1 мМ/л 10 мин (полож. контроль);

Е — клетки Jurkat отмывали от индукторов и доинкубировали 6 ч в ростовой среде без индукторов

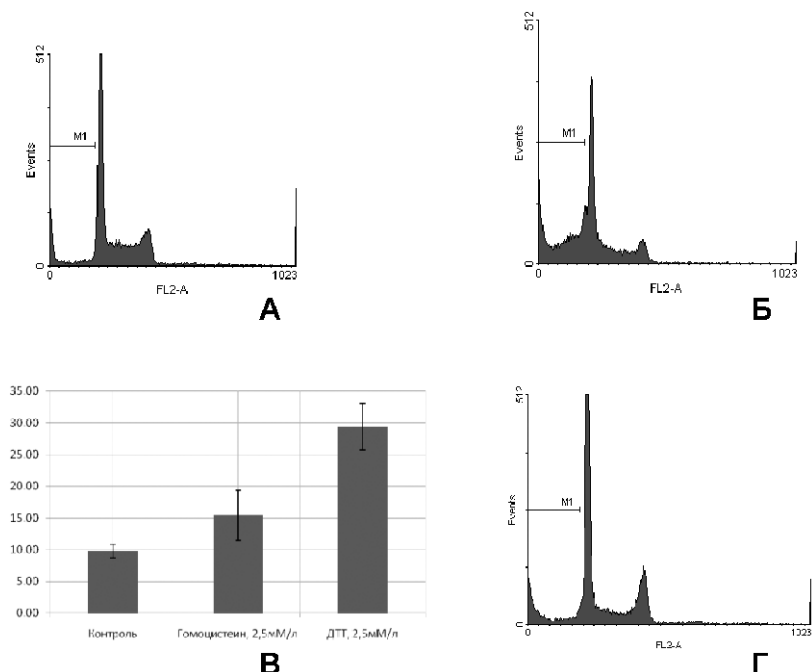


Рис. 3. Анализ индукции апоптоза клеток Jurkat, инкубированных с ДТТ и гомоцистеином 18 ч с последующей отмывкой и дополнительной инкубацией в течение 6 ч:

А, Б – однопараметрические гистограммы: А – контроль, 24 ч без воздействия; Б – ДТТ 2,5 мМ/л, 24 ч; В – гомоцистеин 2,5 мМ/л, 24 ч

Апоптоз клеток при действии ДТТ и гомоцистеина

Как видно из приведенных однопараметрических гистограмм (интервал sub-G1, рис. 3А,Б) и графика, отражающего долю апоптотических клеток, действие индуктора ДТТ приводит к росту апоптоза (29,35%). Гомоцистеин оказывает заметно меньшее действие на клетки, процент апоптотических клеток составляет 15,40%.

Таким образом, действие ДТТ в клетках Jurkat приводит к индукции стресса ЭПР и принятию решения об индукции апоптоза частью клеточной популяции. Действие гомоцистеина сопряжено с небольшим ростом процента апоптотических клеток, однако, для концентрации 2,5 мМ/л нами не показана индукция ЭПР-стресс-ассоциированных белков, что может, по-видимому, свидетельствовать об ином механизме действия гомоцистеина, возможно, опосредуемом митохондриями. Падение выживаемости клеток в условиях восстановительного стресса при действии ДТТ может быть обусловлено, по-видимому, изменениями тиол-дисульфидного статуса протеома клетки. Важной стороной этого вопроса может быть модуляция процессов окислительного фолдинга.

Кроме непосредственного действия на белки в люмене эндоплазматического ретикулума, ДТТ снижает уровень АФК в клетке. Ряд недавних исследований указывает на наличие альтернативных механизмов

формирования дисульфидных связей в клетках млекопитающих [9]. Предполагаемыми участниками этих процессов наряду с ферментами, в частности, семейства QSOX [1], могут быть низкомолекулярные окислители. В частности, показана возможность окисления пероксиредоксинов (peroxiredoxin-4, Prx4) ЭПР перекисью водорода и непосредственное участие перекиси водорода в процессах образования дисульфидных связей *in vitro* с минимальным окислительным повреждением белков [7, 12]. В клетках Jurkat продукция АФК при стрессе ЭПР не повышена, что может быть ассоциировано со сравнительно не высоким уровнем синтеза белка «на экспорт». Однако не исключено, что для других типов клеток наблюдавшаяся повышенная продукция АФК при стрессе ЭПР может представлять собой в определенной степени адаптивный процесс, направленный на поддержание окислительно-восстановительного баланса ЭПР и окислительного фолдинга. В связи с этим интересна функциональная взаимосвязь и физическая ассоциация эндоплазматической и митохондриальной ретикулярных сетей [3]. Следует отметить ряд исследований, указывающих на участие митохондрий в процессах формирования дисульфидных связей. В частности, показана роль продуцируемых митохондриями АФК в регуляции дисульфидных связей белков протеома в клетках млекопитающих [15].

Таким образом, ДТГ в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека Jurkat вызывает окислительно-восстановительный дисбаланс, сопровождающийся стрессом эндоплазматического ретикулума, снижением концентрации внутриклеточных активных форм кислорода и индукцией апоптоза в части клеточной популяции. Гомоцистеин не является для данного типа клеток эффективным индуктором стресса ЭПР в исследованном диапазоне концентраций, его действие сводится к менее выраженным по сравнению с ДТГ изменениям внутриклеточного пула АФК.

Список литературы

1. *Chakravarthi S., Jessop C.E., Willer M., Stirling C.J., Bulleid N.J.* Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1 // *Biochem. J.* — 2007. — 404. — P. 403–411.
2. *Ellgaard L., Molinari M., Helenius A.* Setting the standards: Quality control in the secretory pathway // *Science.* — 1999. — 286. — P. 1882–1888.
3. *Johnson J.D., Bround M.J., White S.A., Luciani D.S.* Nanospaces between endoplasmic reticulum and mitochondria as control centres of pancreatic β -cell metabolism and survival // *Protoplasma.* — 2012. — 249 (Suppl. 1). — S49–S58.
4. *Gomez J., Sanchez-Roman I., Gomez A., Sanchez C., Suarez H., Lopez-Torres M., Barja G.* Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro // *J. Bioenerg. Biomembr.* — 2011. — 43. — P. 377–386.
5. *Griffith O.W.* Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis // *Free Radic. Biol. Med.* — 1999. — 27. — P. 922–935.
6. *Hartl F.U., Hayer-Hartl M.* Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — 16. — P. 574–581.
7. *Kakihana T., Nagata K., Sitia R.* Peroxides and Peroxidases in the Endoplasmic Reticulum: Integrating Redox Homeostasis and Oxidative Folding // *Antioxidants & redox signaling.* — 2012. — Vol. 16, 8. — P. 763–771.
8. *Malhotra J.D., Kaufman R.J.* Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? // *Antioxidants & redox signaling.* — 2007. — Vol. 9, №12. — P. 2277–2293.
9. *Margittai E., Banhegyi G.* Oxidative folding in the endoplasmic reticulum: Towards a multiple oxidant hypothesis? // *FEBS Letters.* — 2010. — 584. — P. 2995–2998.
10. *Merksamer P.I., Trusina A., Papa F.R.* Real-Time Redox Measurements during Endoplasmic Reticulum Stress Reveal Interlinked Protein Folding Functions // *Cell.* — 2008. — 135, 26. — P. 933–947.
11. *Outinen P.A., Sood S.K., Pfeifer S.I.* et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells // *Blood.* — 1999. — 94. — P. 959–967.
12. *Ruddock L.W.* Low-Molecular-Weight Oxidants Involved in Disulfide Bond Formation // *Antioxidants & redox signaling.* — 2012. — Vol. 16, 10. — P. 1129–1138.
13. *Tu B.P., Weissman J.S.* The FAD- and O(2)-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum // *Mol. Cell.* — 2002. — 10. — P. 983–994.
14. *Tu B.P., Weissman J.S.* Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences // *J. Cell. Biol.* — 2004. — 164. — P. 341–346.
15. *Yang Y., Song Y., Loscalzo J.* Regulation of the protein disulfide proteome by mitochondria in mammalian cells // *PNAS.* — 2007. — Vol. 104, №26. — P. 10813–10817.
16. *Zhang C.* et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response // *J. Biol. Chem.* — 2001. — 276. — P. 35867–35874.

Поступила 18.05.12

Сведения об авторах:

Игнашкова Татьяна Игоревна, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ «НИИОПП» РАМН

Мещерский Михаил Евгеньевич, научн. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса

Акопов Александр Сергеевич, аспирант лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса ФГБУ НИИОПП РАМН

Соколовская Алиса Анатольевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. функциональной геномики и липидомики ФГБУ НИИОПП РАМН

Кубатиев Аслан Амирханович, д-р мед. наук, проф., акад. РАМН, зав. лаб. молекулярных механизмов тромбогенеза и тромболизиса, директор ФГБУ НИИОПП РАМН