

УДК 616.248

doi: 10.26907/2542-064X.2019.4.505-520

**АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ КЛЮЧЕВЫХ
БЕЛКОВ-РЕГУЛЯТОРОВ АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ
В Т-ЛИМФОЦИТАХ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

*Ю.В. Скибо¹, М.В. Тихомирова¹, С.Н. Абрамов¹, Э.М. Биктагирова¹,
И.Д. Решетникова^{1,2}, Н.И. Акберова¹, З.И. Абрамова¹*

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора, г. Казань, 420015, Россия

Аннотация

Статья посвящена изучению содержания основных белков апоптоза (каспазы-3, Bcl-2) и аутофагии (LC3-II, Rubicon, UVRAG) в Т-клетках больных легкой и тяжелой формами атопической бронхиальной астмы. Анализ проводился на свежесыводенных и культивированных клетках в течение 3 и 6 сут. Результаты исследования содержания апоптотических белков показали, что культивирование клеток сопровождается снижением содержания активной формы каспазы-3 и повышением белка Bcl-2 в группах больных астмой, причем выявленные изменения возрастают с увеличением тяжести заболевания. Анализ белков аутофагии показал наличие II формы LC3-белка в группе с тяжелой формой заболевания и повышение содержания Rubicon и UVRAG по сравнению с контрольной группой. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что для обеих исследованных групп больных астмой характерно торможение апоптоза Т-лимфоцитов. Наиболее выраженная устойчивость установлена в группе с тяжелой формой заболевания. Снижение апоптотической активности сопровождается повышением аутофагического процесса, который, по-видимому, служит альтернативным путем гибели клеток.

Ключевые слова: бронхиальная астма, Т-лимфоциты, апоптоз, аутофагия, каспаза-3, Bcl-2, LC3B, Rubicon, UVRAG

Введение

Бронхиальная астма, характеризующаяся воспалением дыхательных путей, как правило, сопровождается инфильтрацией Т-лимфоцитов и эозинофилов, повышенной секрецией провоспалительных цитокинов и обратимой обструкцией бронхов [1]. Известно, что персистенция воспаления дыхательных путей зависит от снижения апоптоза активированных эозинофилов и Т-лимфоцитов [2, 3]. Существуют три различных механизма реализации апоптоза: первый активируется сигналами, поступающими в клетку из вне; второй опосредован активаторами гибели клеток, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности этих клеток (FasL, TNF), и третий может быть опосредован реактивными формами кислорода.

Члены семейства белков Bcl-2 также могут быть вовлечены в этот процесс. Белок Bcl-2 подавляет апоптоз, предотвращая активацию каспаз, которые осуществляют процесс. Каспазы являются ключевыми медиаторами запрограммированной гибели клеток. Среди них каспаза-3 занимает центральное место, являясь

эффекторным белком, поскольку активирует апоптотические эндонуклеазы, связывая ингибитор этих нуклеаз, что приводит к цитоморфологическим и биохимическим изменениям в клетке, характерным для апоптоза [4, 5].

Апоптоз является наиболее изученной формой гибели клеток. Однако в последние годы большой интерес вызывает другая форма программированной клеточной гибели (ПКГ) – аутофагия. Последняя способствует удалению цитоплазматических компонентов и активируется в ответ на изменение внешних и внутренних условий, например на истощение питательных веществ, и таким образом поддерживает жизнедеятельность клетки в стрессовых условиях [6–8]. С другой стороны, аутофагия может быть механизмом гибели (ПКГ II типа), при котором, в отличие от апоптоза, сначала происходит деградация органелл, а уже на поздних стадиях коллапс элементов цитоскелета [9]. Наиболее изученным белком аутофагии является LC3-белок, его преобразование из цитоплазматической LC3-I-формы в LC3-II-форму, непосредственно связанную с двойной мембраной аутофагосомы, используется для мониторинга процесса. Относительное количество мембраносвязанных LC3-II отражает количество аутофагосом, так что индукцию и ингибирование аутофагии можно контролировать путем измерения количества цитоплазматического (LC3-I) и мембраносвязанного (LC3-II) белка с помощью иммунологического анализа [10–14].

Для завершения процесса аутофагии необходимо слияние аутофагосомы с лизосомами, поскольку сами аутофагические вакуоли не содержат гидролаз. Одними из регуляторов этого процесса являются белки UVRAG и Rubicon в составе комплексов: Vps34-Vps15-Becn1-UVRAG и Vps34-Vps15-Becn1-UVRAG-Rubicon [15–18]. При этом UVRAG и Rubicon являются антагонистами, выполняющими противоположные функции: UVRAG в комплексе с Becn1 индуцирует биосинтез аутофагосомы, ее созревание, регулирует эндоцитоз, и в составе с VPS-комплексом класса C отвечает за связывание везикул (этап, предшествующий этапу слияния аутофагосомы с лизосомой). Белок Rubicon является негативным регулятором аутофагии. Было показано, что его повышенная экспрессия сопровождалась избыточным числом незрелых аутофагосом [16, 17].

На основании всех этих данных была поставлена цель – провести анализ экспрессии ключевых белков апоптоза (каспаза-3, Bcl-2) и аутофагии (LC3, UVRAG, Rubicon) в Т-лимфоцитах, выделенных из периферической крови больных атопической бронхиальной астмой (АБА) с разной степенью тяжести. Полученные результаты позволят судить о степени вовлеченности каждого из этих процессов в патогенез заболевания.

1. Материалы и методы

1.1. Объект исследования. В качестве объекта исследования были использованы Т-лимфоциты периферической крови здоровых доноров и больных АБА (легкой и тяжелой степени). Образцы периферической крови больных АБА были получены у пациентов, состоящих на учете в специализированной консультативно-диагностической поликлинике инфекционно-аллергических заболеваний ФБУН Казанского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, г. Казань (договор о научно-исследовательской работе № 5299091012). От пациентов получено информированное согласие

на использование образцов в исследовании. У 15 пациентов установлен диагноз АБА легкого персистирующего течения, у 20 пациентов – АБА персистирующего течения тяжелой степени. Диагноз и степень тяжести АБА верифицировали согласно критериям «Глобальной стратегии диагностики, профилактики и лечения астмы» (GINA, 2018) и Федеральным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению бронхиальной астмы (Российское респираторное общество, 2016 г.). Группу контроля составили 15 практически здоровых добровольцев в возрасте от 20 до 34 лет (средний возраст 27 ± 7 лет), которые не имели отягощенного аллергологического анамнеза, с отрицательными результатами кожных аллергопроб, уровнем IgE менее 100 МЕ/мл, стандартными показателями функции внешнего дыхания.

1.2. Выделение Т-лимфоцитов Лимфоциты выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1.077$). Для получения популяции Т-лимфоцитов использовали метод иммуномагнитной сепарации (Dyna-beads Untouched Human T cells, Dynal, Invitrogen). Подсчет клеток проводили в камере Горяев. Клетки были окрашены 0.1%-ным раствором трипанового синего.

1.3. Культивирование Т-лимфоцитов. К полученному осадку Т-лимфоцитов добавляли среду RPMI-1640, содержащую эмбриональную телячью сыворотку (10%), пенициллин/ стрептомицин (5000 ед./мл / 5000 мкг/мл) и L-глютамин (1%) из расчета, что на 1 лунку необходим 1 мл клеточной суспензии с концентрацией $2 \cdot 10^6$ мл. Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С, содержащей 5% CO₂ в течение 3 и 6 сут.

1.4. Вестерн-блот-анализ белков. К клеточному осадку добавляли 50 мкл RIPA буфер с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (Thermo Scientific). Полученные клеточные лизаты замораживались, хранились при –20 °С и размораживались непосредственно перед электрофорезом. Определение концентрации белка в образцах проводили с использованием набора BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Перед нанесением на гель в образцы добавляли 0.5 мкл 1%-ного бромфенолового синего. Электрофорез лизатов, содержащих ~20 мкг белка, проводили через SDS-PAGE в 10–20%-ном градиентном геле. После окончания электрофореза гель помещали в трансфер-буфер (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20%-ный метанол, pH 8.3) и переносили белки на PVDF мембрану (Merck Millipore) в течение 1 ч при напряжении 350 В. После трансфера мембрану инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами и визуализировали с применением ECL-набора на основе хемилюминисцентного субстрата (Bio-Rad). Были использованы первичные антитела мыши к Bcl-2 (Cell Signaling Technology), антитела кролика к LC3 (Cell Signaling Technology), антитела кролика к каспазе-3 (Invitrogen), антитела к UVRAG (Invitrogen), антитела Rubicon (Invitrogen), антитела кролика к актину (Cell Signaling Technology) и антитела к GAPDH (Invitrogen). В качестве вторичных были использованы антитела, конъюгированные с пероксидазой (Life Technologies). Мы также применяли белковый маркер MagicMark XP (Invitrogen, Molecular Probes).

1.5. Статистический анализ данных. Обработку результатов проводили в статистической среде R. Для представления данных использовали боксплоты. Для сравнения трех групп применяли критерий Крускала – Уоллиса с последующими парными сравнениями с поправкой Бонферрони и Бенжамини – Хоккберга. Две группы сравнивали с использованием критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

2. Результаты

2.1. Анализ содержания каспазы-3 в Т-лимфоцитах. Биохимическим маркером активации апоптоза в клетках служит протеолитическое расщепление про-каспазы-3 с образованием эффекторной каспазы-3. В апоптотических клетках активная каспаза-3 расщепляет ингибитор ICAD, что высвобождает эндонуклеазу CAD. Активность фермента приводит к деградации хромосомной ДНК, вызывая конденсацию хроматина. Таким образом, повышение содержания каспазы-3 и, соответственно, снижение ее неактивной формы (прокаспазы-3) является показателем интенсивности апоптоза в клетках [19]. Анализ соотношения каспаза-3/прокаспазы-3 (условно обозначенного как коэффициент κ) проводился во всех исследуемых группах после 3 и 6 сут культивирования Т-лимфоцитов (рис. 1).

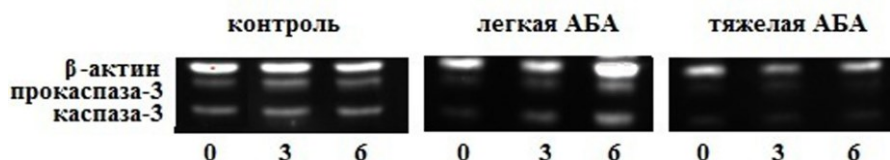


Рис. 1. Оценка содержания прокаспазы-3 и ее активной формы каспазы-3 в лизатах Т-лимфоцитов после 3 и 6 сут культивирования методом вестерн-блоттинга. На иммунограммах представлены контрольные лизаты клеток и образцы лизатов, полученные из клеток больных легкой и тяжелой формами АБА. В качестве «загрузочного» контроля использован β -актин. Содержание каспазы-3 и прокаспазы-3 в разных клеточных лизатах нормализовано по уровню β -актина

Сравнительный анализ между группами показал, что имеется достоверное снижение ($p = 1.795 \cdot 10^{-10}$) коэффициента κ в группе с тяжелой формой астмы (рис. 2, а). Сравнительный анализ значения коэффициента κ в динамике внутри каждой группы показал, что в группе со здоровыми донорами нет значимых различий ($p = 0.056$), но есть тенденция к снижению на 3-е и 6-е сутки ($p = 0.067$) (рис. 2, б). Не оказалось статистически значимых различий в группе с легкой формой АБА ($p = 0.102$) (рис. 2, в). Только в группе с тяжелой АБА показано значимое снижение коэффициента κ на 6-е сутки по сравнению с 3-ми ($p = 0.022$) (рис. 2, г).

Суммируя полученные результаты можно сказать, что культивирование Т-лимфоцитов в течение 3 сут оказывает различное влияние на клетки в зависимости от тяжести заболевания. В группе контроля показатель κ снизился и достиг значения меньше 1, то есть количество активной формы каспазы-3 стало меньше, чем на начальной стадии культивирования. В группе с легкой формой астмы этот показатель не изменился. Только в группе с тяжелой формой астмы значение κ выросло по отношению к начальному значению. Однако оно осталось наименьшим, если сравнивать с соответствующими значениями в других группах.

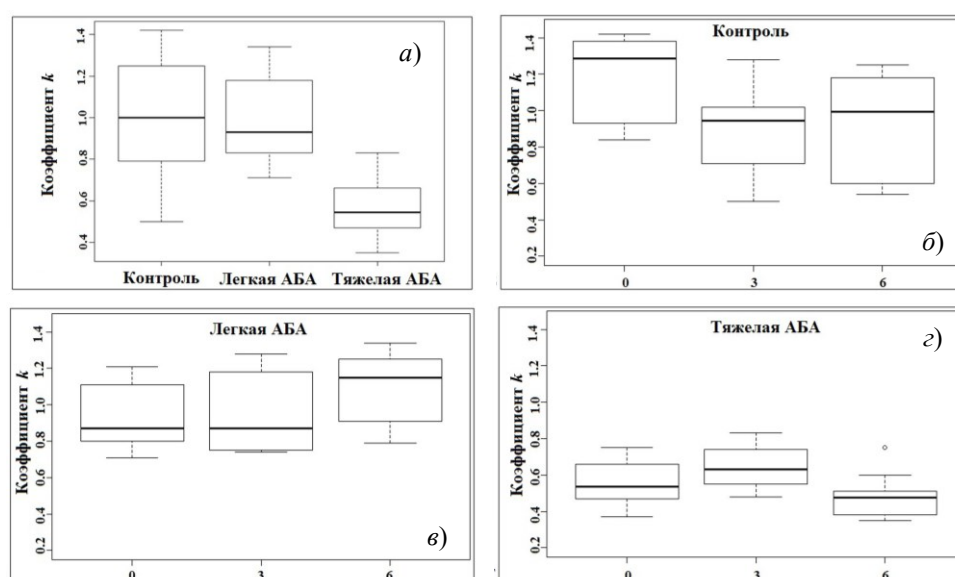


Рис. 2. Результаты статистического анализа данных экспрессии каспазы-3 и ее неактивной формы в Т-лимфоцитах, полученных от здоровых доноров и больных легкой и тяжелой формами астмы. Анализ проводился в свежевыделенных клетках культивированных клетках в течение 3 и 6 сут: а) межгрупповой анализ коэффициента k в трех группах с применением критерия Крускала – Уоллиса с последующими парными сравнениями с поправкой Бонферрони и Бенжамини – Хокгберга; б) анализ коэффициента k в группе контроля в динамике (0, 3 и 6 сут); в) анализ коэффициента k в группе с легкой формой АБА в динамике (0, 3 и 6 сут); г) анализ коэффициента k в группе с тяжелой формой АБА в динамике (0, 3 и 6 сут)

Более длительное культивирование клеток (6 сут) сопровождается снижением питательных веществ в среде и, как следствие, голоданием клеток, которое должно приводить к индукции апоптоза. Действительно, повышение значения k было установлено в группе контроля и группе с легкой формой астмы, причем в группе с астмой оно было выше 1, в контрольной равнялось 1. Таким образом, в обеих группах отмечается рост активированной каспазы-3, особенно в клетках больных легкой астмой, что говорит об активации апоптоза. Только в группе с тяжелой формой заболевания значение коэффициента k снизилось по отношению к значению k на 3-е сутки, то есть клетки больных тяжелой формой астмы проявляли устойчивость к апоптозу.

2.2. Анализ содержания Bcl-2-белка в Т-лимфоцитах Определение содержания Bcl-2-белка в клетках во всех исследуемых группах было также проведено на 3-е и 6-е сутки культивирования (рис. 3). В контрольной группе установлена слабая экспрессия в свежевыделенных клетках, которая незначительно повысилась к 3-м суткам. На 6-е сутки содержание Bcl-2 в клетках также осталось незначительным.

В группе с легкой формой астмы наиболее высокое содержание белка установлено на 3-е сутки культивирования, к 6-м суткам содержание Bcl-2 снизилось. Однако его содержание было несколько выше, чем в группе контроля. Наиболее высокая экспрессия Bcl-2-белка установлена в группе с тяжелой формой астмы

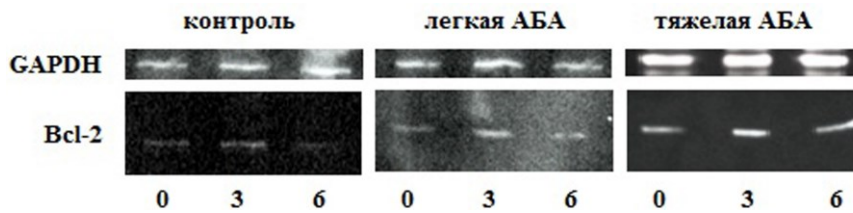


Рис. 3. Анализ содержания Bcl-2-белка в лизатах Т-лимфоцитов после 3 и 6 сут культивирования методом вестерн-блоттинга. На иммунограммах представлены контрольные лизаты клеток и образцы лизатов, полученные из клеток больных легкой и тяжелой формами АБА. В качестве «загрузочного» контроля использован GAPDH

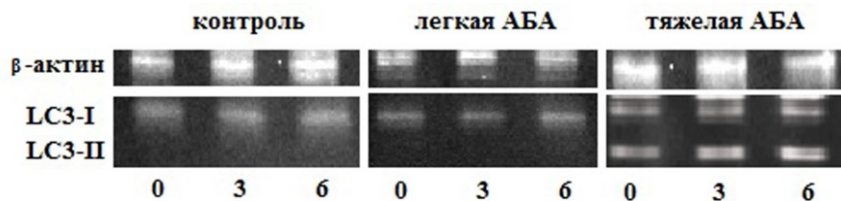


Рис. 4. Анализ содержания LC3-I- и LC3-II-белка в лизатах Т-лимфоцитов после 3 и 6 сут культивирования методом вестерн-блоттинга. На иммунограммах представлены контрольные лизаты клеток и образцы лизатов, полученные из клеток больных легкой и тяжелой формами АБА. В качестве «загрузочного» контроля использован β -актин. Содержание каспазы-3 и прокаспазы-3 в разных клеточных лизатах нормализовано по уровню β -актина

(рис. 3). Так же, как и в клетках больных легкой астмой и в контроле, его экспрессия была наиболее высокой на 3-е сутки, но, в отличие от них, на 6-е сутки снижение его количества было незначительным.

2.3. Анализ содержания LC3-II-белка в Т-лимфоцитах. LC3-белок (микротубулин-связанный белок легкой цепи 3) присутствует в цитозоле большинства типов клеток и существует в трех изоформах (А, В и С). При запуске аутофагии под воздействием цистеиновой протеазы Atg4 LC3 протеолитически разрушается, образуя цитоплазматическую LC3-I-форму [10]. LC3-I-белок затем активируется с помощью E1-подобного фермента Atg7 и переносится к Atg3-белку для его конъюгации с фосфатидилэтаноламином и образования LC3-II-формы. Таким образом, LC3-II-белок вовлекается в процесс синтеза и роста фагосома и локализуется на внутренней и внешней мембранах аутофагосомы. Трансформация цитоплазматического белка LC3-I (18 кДа) в мембранный белок аутофагосом – LC3-II (16 кДа) – значительно усиливается при культивировании клеток в условиях голодания (без аминокислот и сыворотки), что свидетельствует об активизации процесса аутофагии. Поэтому количество LC3-II хорошо коррелирует с числом аутофагосом. Эта характеристика преобразования LC3 может быть использована для мониторинга аутофагии [12, 14].

Результаты иммуноблоттинга показали, что у здоровых доноров маркерный белок аутофагии присутствует в LC3-I-форме, которая находится в цитоплазме и не связана с формированием аутофагосом (рис. 4), но свидетельствует об инициации процесса аутофагии. Аналогичные результаты были получены в группе больных легкой формой астмы. Культивирование Т-лимфоцитов в течение 3 и 6 сут не влияло на индукцию образования LC3-II-формы. Эта форма белка была обна-

ружена только в лизатах клеток больных тяжелой формой астмы, причем как в свежевыделенных клетках, так и на 3-е и 6-е сутки культивирования.

2.4. Анализ содержания белков Rubicon и Uvrac в Т-лимфоцитах. После формирования аутофагосомы наступает следующий этап – ее слияние с лизосомой с образованием аутофаголизосомы. Именно лизосомы содержат гидролазы, необходимые для переваривания клеточных компонентов. Процесс слияния лизосом с аутофагосомами может позитивно регулироваться комплексом UVRAG-Vps34-beclin 1 PI3K, а также подвергаться негативной регуляции комплексом Rubicon-UVRAG-Vps34-beclin 1 PI3K [15, 17], то есть ключевыми регуляторами являются белки UVRAG и Rubicon.

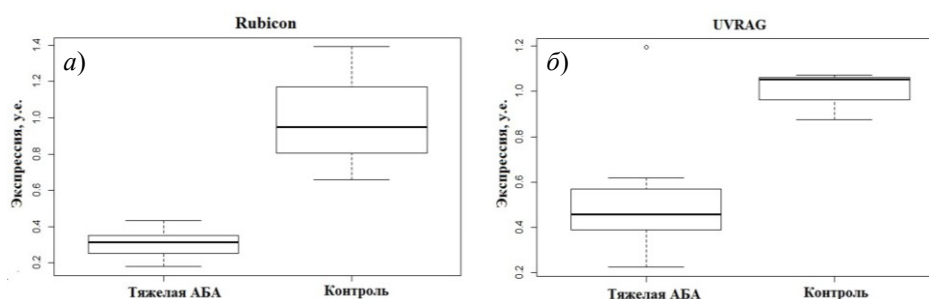


Рис. 5. Результаты статистического анализа данных экспрессии белков Rubicon (а) и UVRAG (б) в Т-лимфоцитах, полученных от здоровых доноров и больных тяжелой формой астмы. Анализ проводился в свежевыделенных клетках. Для представления данных использовали боксплоты. Для сравнения применялся критерий Уилкоксона

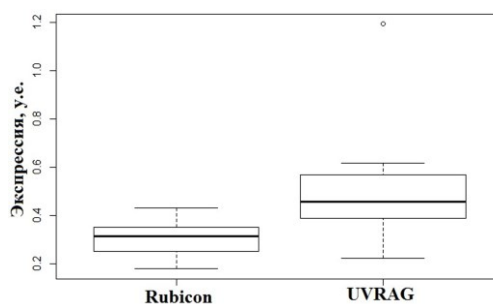


Рис. 6. Сравнительный анализ содержания белков Rubicon и UVRAG в Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмы. Анализ проводился в свежевыделенных клетках. Для представления данных использовали боксплоты. Для сравнения применялся критерий Уилкоксона

Мы проанализировали экспрессию данных белков в Т-лимфоцитах пациентов с тяжелой формой астмы, так как экспрессия LC3-II-белка была обнаружена в клетках только в данной исследуемой группе. Мы установили, что имеется достоверно высокое содержание UVRAG в группе с тяжелой формой астмы по сравнению с контрольной ($p = 0.031$) (рис. 5, а). Количество белка Rubicon также оказалось выше в группе больных астмой, чем у здоровых доноров ($p = 0.017$). Сравнительный анализ содержания этих двух белков показал, что экспрессия иницирующего белка UVRAG по сравнению с Rubicon достоверно выше ($p = 0.0097$) (рис. 6).

Полученные результаты подтверждают, что в Т-лимфоцитах больных тяжелой формой астмы развивается процесс аутофагии.

3. Обсуждение

Дисрегуляция аутофагии была выявлена при ряде заболеваний, включая иммунные расстройства. Тем не менее вопрос о том, как именно влияет аутофагия на активность иммунных клеток, остается противоречивым отчасти из-за сложного функционального и молекулярного пересечения аутофагии и апоптоза. Первая заслуживающая внимания связь аутофагии с патогенезом заболеваний появилась, когда лаборатория Бет Левин (Beth Levine) идентифицировала Bcl-1 как человеческий гомолог Atg6 дрожжей на основании его способности взаимодействовать с антиапоптотическим белком Bcl-2 [20]. В результате голодания киназа JNK1 фосфорилирует Bcl-2 и способствует его высвобождению, в результате чего Bcl-1 способствует активации аутофагии, а белок Bcl-2 предотвращает активацию апоптоза. Несмотря на сравнительно длительный период исследований в области апоптоза лимфоцитов крови больных бронхиальной астмой, данные разных групп ученых в настоящее время расходятся.

Одними учеными признается повышение апоптотической активности лимфоцитов больных астмой [21, 22]. Другие исследователи отмечают ингибирование апоптоза данной популяции клеток в условиях *in vitro* [23, 24].

Анализируя экспрессию двух ключевых апоптотических белков-антагонистов (каспазы-3 и Bcl-2), мы показали, что происходит снижение каспазной активности (а именно коэффициента k) и увеличение содержания Bcl-2-белка с увеличением тяжести заболевания (рис. 1).

Как отмечалось выше, протеолитическое расщепление прокаспазы-3 с образованием эффекторной каспазы-3 (активной формы) служит биохимическим маркером активации апоптоза в клетках. В настоящей работе при исследовании активной и неактивной (прокаспазы) форм каспазы-3 в клетках больных тяжелой и легкой формами астмы значение k было ниже 1. Это означает, что количество прокаспазы 3 выше, чем ее активной формы, однако внутри этих двух групп также были различия. Так, в группе с легкой формой заболевания количество активной каспазы-3 в свежеразделенных клетках ниже по сравнению с неактивной. Но в процессе культивирования клеток значение показателя k увеличивается, что указывает на активацию спонтанного апоптоза в ответ на стресс (снижение питательных веществ в культуральной среде). Наименьшим значением коэффициента k было в группе с тяжелой формой заболевания, и за все время культивирования это значение практически не изменялось (отмечено лишь незначительное его увеличение на 3-е сутки культивирования).

Таким образом, в Т-клетках данной категории больных отмечается устойчивость клеток к апоптозу при стрессе.

Содержание Bcl-2-белка в лимфоцитах больных астмой является спорным вопросом. А. Хамзоуи с соавторами показали [23], что лимфоциты, выделенные из мокроты больных астмой, содержат повышенное количество белка. С другой стороны, С. Янг с коллегами [24] сообщили о сниженной экспрессии Bcl-2 в лимфоцитах, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа больных астмой по сравнению со здоровыми донорами. В своем исследовании Ф.С. Абдуламир

с соавторами [25] пытался объяснить данное разногласие, указав, что экспрессия Bcl-2 в лимфоцитах зависит от тяжести заболевания. В целом повышение экспрессии Bcl-2 в лимфоцитах больных астмой по сравнению со здоровыми донорами происходит независимо от тяжести заболевания.

Проведенное нами исследование согласуется с результатами работ [26, 27], подтверждая теорию, что экспрессия анти-апоптотического белка повышается с увеличением тяжести заболевания. Однако мы можем добавить, что экспрессия Bcl-2 также повышается и с увеличением времени культивирования, в процессе которого создаются стрессовые условия, стимулирующие в норме запуск апоптоза. А повышающаяся экспрессия белка говорит об устойчивости Т-лимфоцитов к гибели.

Различными исследователями было показано, что снижение апоптоза может сопровождаться активацией аутофагии [28, 29]. Сообщается о вовлеченности аутофагии в различные биологические процессы, в том числе воспалительные реакции и воспалительные заболевания.

В настоящее время имеется всего несколько сообщений об активации аутофагии при развитии бронхиальной астмы [1, 29–31]. С помощью электронной микроскопии на биопсийных образцах бронхов было показано повышенное число двойных мембран аутофагосом в фибробластах и эпителиальных клетках [32]. В работе [29] установлен высокий уровень аутофагии в группе с тяжелой формой астмы в гранулоцитах из мокроты, а также в клетках периферической крови.

Оценку активации аутофагии мы проводили по наличию экспрессии LC3-II-белка, являющегося специфическим маркером процесса. Результаты иммуноблоттинга показали, что в лимфоцитах здоровых доноров маркерный белок аутофагии присутствует в LC3-I-форме, которая находится в цитоплазме, и его наличие говорит об инициации процесса аутофагии (рис. 4). Культивирование Т-лимфоцитов в течение 6 сут также не повлияло на образование II формы белка. Аналогичные результаты были получены и в группе больных легкой формой АБА. Только в лизатах клеток больных тяжелой формой астмы обнаружена II мембраносвязанная форма LC3-белка (рис. 4). Тенденция к увеличению уровня LC3-II и снижению показателя LC3I/ LC3-II у больных тяжелой формой астмы может свидетельствовать о нарушении слияния аутофагосом и лизосом и, следовательно, о незавершенной аутофагии, приводящей к накоплению большого числа аутофагосом внутри клеток и, как следствие, к нарушению клиренса апоптотического материала [33].

Таким образом, полученные данные согласуются с результатами работы [34] с той лишь разницей, что наш эксперимент был проведен на Т-лимфоцитах и является дополнительным подтверждением активации аутофагии в группе с тяжелой формой бронхиальной астмы.

На заключительном этапе исследования был проведен анализ содержания белков UVRAG и Rubicon в Т-лимфоцитах периферической крови в группе с тяжелой формой астмы. В свежевыделенных клетках экспрессия белков была невысокой. Однако мы установили, что имеется достоверное повышение содержания белка UVRAG по сравнению с Rubicon. Оба этих белка являются компонентами комплекса PI3K и участвуют в эндоцитозе, формировании аутофагосом и/или слиянии лизосом с аутофагосомой через Rab7 [16, 21], но имеют противоположный

эффект. UVRAG способствует слиянию аутофагосомы с лизосомой, тогда как Rubicon ингибирует этот процесс. UVRAG, который локализуется на эндоплазматическом ретикулуме и эндосомах, связывается с Vps16 и HOPS [33], стимулируя в Rab7 ГТФ-азную активность и слияние аутофагосомы с лизосомой, а Rubicon, связываясь с UVRAG, отрицательно регулирует Vps34 активность [34].

Суммируя полученные данные, а также результаты по апоптотическим белкам, можно сделать вывод, что для Т-лимфоцитов, выделенных из периферической крови больных легкой формой астмы, характерно торможение апоптоза (по сравнению со здоровыми донорами). Однако стрессовые условия (такие, как снижение питательных веществ в культуральной среде) стимулируют запуск апоптоза, что проявляется в увеличении содержания каспазы-3 и снижении экспрессии Bcl-2 на 6-е сутки. Для клеток, полученных от лиц с тяжелой формой заболевания, также установлено торможение апоптоза. Но, в отличие от группы больных легкой формой астмы, культивирование клеток не вызывает увеличение апоптотической активности, а происходит активация аутофагии.

Мы предполагаем, что для данной группы больных аутофагия является компенсаторным механизмом сохранения жизни клеток, который приводит к нарушению клиренса апоптотического материала, однако эта теория требует проведения дальнейшего исследования.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00739.

Литература

1. *Jyothula S.S., Eissa N.T.* Autophagy and role in asthma // *Curr. Opin. Pulm. Med.* – 2013. – V. 19, No 1. – P. 30–35. – doi: 10.1097/MCP.0b013e32835b1150.
2. *Potapinska O., Demkow U.* T lymphocyte apoptosis in asthma // *Eur. J. Med. Res.* – 2009. – V. 14, Suppl. IV. – P. 192–195. – doi: 10.1186/2047-783X-14-S4-192.
3. *Walsh G.M.* Eosinophil apoptosis and clearance in asthma // *J. Cell Death.* – 2013. – V. 6. – P. 17–25. – doi: 10.4137/JCD.S10818.
4. *Novershtern N., Itzhaki Z., Manor O., Friedman N., Kaminski N.* A functional and regulatory map of asthma // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2008. – V. 38. – P. 324–336. – doi: 10.1165/rcmb.2007-0151OC.
5. *Holtzman M.J., Green J.M., Jayaraman S., Arch R.H.* Regulation of T cell apoptosis // *Apoptosis.* – 2000. – V. 5, No 5. – P. 459–471. – doi: 10.1023/a:1009657321461.
6. *Yuan J., Kroemer G.* Alternative cell death mechanisms in development and beyond // *Genes Dev.* – 2010. – V. 24, No 23. – P. 2592–2602. – doi: 10.1101/gad.1984410.
7. *Klionsky D.J.* The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions // *J. Cell Sci.* – 2005. – V. 118, Pt. 1. – P. 7–18. – doi: 10.1242/jcs.01620.
8. *Yu L., Chen Y., Tooze S.A.* Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms // *Autophagy.* – 2018. – V. 14, No 2. – P. 207–215. – doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.
9. *Loos B., Engelbrecht A.M., Lockshin R.A., Klionsky D.J., Zakeri Z.* The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions // *Autophagy.* – 2013. – V. 9, No 9. – P. 1270–1285. – doi: 10.4161/auto.25560.
10. *Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Akitsugu Y., Takayoshi K., Takeshi N., Eiki K., Yoshinori O., Tamotsu O.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in

- autophagosome membranes after processing // *Embo J.* – 2000. – V. 19, No 21. – P. 5720–5728. – doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.
11. *Tanida I., Ueno T., Kominami E.* LC3 and autophagy // *Methods Mol. Biol.* – 2008. – V. 445. – P. 77–88. – doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
 12. *Yoshii S.R., Mizushima N.* Monitoring and measuring autophagy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – V. 18, No 9. – Art. 1865, P. 1–13. – doi: 10.3390/ijms18091865.
 13. *Jiang P., Mizushima N.* LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells // *Methods.* – 2015. – V. 75. – P. 13–18. – doi: 10.1016/j.ymeth.2014.11.021.
 14. *Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Eskelinen E-L. et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy // *Autophagy.* – 2016. – V. 8, No 4. – P. 445–544. – doi: 10.4161/auto.19496.
 15. *Itakura E., Kishi C., Inoue K., Mizushima N.* Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG // *Mol. Biol. Cell.* – 2008. – V. 19, No 12. – P. 5360–5372. – doi: 10.1091/mbc.E08-01-0080.
 16. *Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., Yue Z.* Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – V. 11, No 4. – P. 468–476. – doi: 10.1038/ncb1854.
 17. *Matsunaga K., Saitoh T., Tabata K., Omori H., Satoh T., Kurotori N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T., Yoshimori T.* Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages // *Nat. Cell Biol.* – 2009. – V. 11, No 4. – P. 385–396. – doi: 10.1038/ncb1846.
 18. *Funderburk S.F., Wang Q.J., Yue Z.* The Beclin 1-VPS34 complex – at the crossroads of autophagy and beyond // *Trends Cell Biol.* – 2010. – V. 20, No 6. – P. 355–362. – doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.002.
 19. *Мамонтова Т.В., Кайдашев И.П.* Новые аспекты апоптоза мононуклеарных клеток в патогенезе атопической бронхиальной астмы // *Аллергология.* – 2005. – № 4. – С. 15–23.
 20. *Grzegorzczak J., Kowalski M.L., Pilat A., Iwaszkiewicz J.* Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: Relation to serum markers of apoptosis // *Mediators Inflammation.* – 2002. – V. 1, No 4. – P. 225–233. – doi: 10.1080/09629350290000087.
 21. *Бойчук С.В., Мустафин И.Г., Фассахов Р.С.* Механизмы апоптоза лимфоцитов периферической крови больных атопической бронхиальной астмой // *Аллергология.* – 2001. – № 1. – С. 3–9.
 22. *Lamb J.P., James A., Carroll N., Siena L., Elliot J., Vignola A.M.* Reduced apoptosis of memory T-cells in the inner airway wall of mild and severe asthma // *Eur. Resp. J.* – 2005. – V. 26, No 2. – P. 265–270. – doi: 10.1183/09031936.05.00144304.
 23. *Hamzaoui A., Hamzaoui K., Salah H., Chabbou A.* Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma // *Mediators Inflammation.* – 1999. – V. 8, No 4–5. – P. 237–243. – doi: 10.1080/09629359990405.
 24. *Ying S., Khan L.N., Meng Q., Barnes N.C., Kay A.B.* Cyclosporin A, apoptosis of BAL T-cells and expression of Bcl-2 in asthmatics // *Eur. Respir. J.* – 2003. – V. 22, No 2. – P. 207–212. – doi: 10.1183/09031936.03.00098902.
 25. *Abdulmir A.S., Hafidh R.R., Abubakar F., Abbas K.A.* Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma // *BMC Immunol.* – 2008. – V. 16. – Art. 73, P. 1–10. – doi: 10.1186/1471-2172-9-73.

26. *Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.* Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – V. 8, No 9. – P. 741–752. – doi: 10.1038/nrm2239.
27. *Marino G., Niso-Santano M., Baehrecke E.H., Kroemer G.* Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2014. – V. 15, No 2. – P. 81–94. – doi: 10.1038/nrm3735.
28. *Martin L.J., Gupta J., Jyothula S.S., Butsch Kovacic M., Biagini Myers J.M., Patterson T.L., Ericksen M.B., He H., Gibson A.M., Baye T.M., Amirisetty S., Tsoras A.M., Sha Y., Eissa N.T., Hershey G.K.* Functional variant in the autophagy-related 5 gene promoter is associated with childhood asthma // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7, No 4. – Art. e33454, P. 1–9. – doi: 10.1371/journal.pone.0033454.
29. *Ban G.Y., Pham D.L., Trinh H.K., Lee S.I., Suh D.H., Yang E.M., Ye Y.M., Shin Y.S., Chwae Y.J., Park H.S.* Autophagy mechanisms in sputum and peripheral blood cells of patients with severe asthma: A new therapeutic target // *Clin. Exp. Allergy.* – 2015. – V. 46, No 1. – P. 48–59. – doi: 10.1111/cea.12585.
30. *Liu J.N., Suh D.H., Trinh H.K., Chwae Y.J., Park H.S., Shin Y.S.* The role of autophagy in allergic inflammation: A new target for severe asthma // *Exp. Mol. Med.* – 2016. – V. 48, No 7. – Art. e243, P. 1–10. – doi: 10.1038/emmm.2016.38.
31. *Poon A.H., Chouiali F., Tse S.M., Litonjua A.A., Hussain S.N., Baglole C.J., Eidelman D.H., Olivenstein R., Martin J.G., Weiss S.T., Hamid Q., Laprise C.* Genetic and histologic evidence for autophagy in asthma pathogenesis // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – V. 129, No 2. – P. 569–571. – doi: 10.1016/j.jaci.2011.09.035.
32. *Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaani D., Oh B.H., Jung J.U.* Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG // *Nat. Cell Biol.* – 2006. – V. 8, No 7. – P. 688–699. – doi: 10.1038/ncb1426.
33. *Liang C., Lee J.S., Inn K.S., Gack M.U., Li Q., Roberts E.A., Vergne I., Deretic V., Feng P., Akazawa C., Jung J.U.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking // *Nat. Cell Biol.* – 2008. – V. 10, No 7. – P. 776–787. – doi: 10.1038/ncb1740.
34. *Sun Q., Zhang J., Fan W., Wong K.N., Ding X., Chen S., Zhong Q.* The RUN domain of Rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, No 1. – P. 185–191. – doi: 10.1074/jbc.M110.126425.

Поступила в редакцию
14.03.19

Скибо Юлия Валерьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: yuliya_ksu@mail.ru

Тихомирова Мария Владимировна, лаборант НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: mary20011994@mail.ru

Абрамов Сергей Николаевич, младший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: 007Abramov@mail.ru

Биктагирова Эльнара Маулетовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *EMBiktagirova@kpfu.ru*

Решетникова Ирина Дмитриевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры фундаментальных основ клинической медицины; заместитель директора по научной и лечебной работе

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
ФБУН КНИИЭМ Роспотребнадзора
ул. Б. Красная, д. 67, г. Казань, 420015, Россия
E-mail: *reshira@mail.ru*

Акберова Наталья Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *nakberova@mail.ru*

Абрамова Зинаида Ивановна, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, главный научный сотрудник НИЛ «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых заболеваний»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *ziabramova@mail.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2019, vol. 161, no. 4, pp. 505–520

doi: 10.26907/2542-064X.2019.4.505-520

Analysis of the Expression of Key Protein Regulators of Apoptosis and Autophagy in T-Lymphocytes of Patients with Bronchial Asthma

Yu.V. Skibo^{a*}, *M.V. Tikhomirova*^{a**}, *S.N. Abramov*^{a***}, *E.M. Biktagirova*^{a****},
I.D. Reshetnikova^{a,b*****}, *N.I. Akberova*^{a*****}, *Z.I. Abramova*^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bFederal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing,
Kazan, 420015 Russia

E-mail: ^{*}*yuliya_ksu@mail.ru*, ^{**}*mary20011994@mail.ru*, ^{***}*007Abramov@mail.ru*,
^{****}*EMBiktagirova@kpfu.ru*, ^{*****}*reshira@mail.ru*, ^{*****}*nakberova@mail.ru*,
^{*****}*ziabramova@mail.ru*

Received March 14, 2019

Abstract

Bronchial asthma is a disease characterized by T-lymphocyte resistance to apoptosis. Recent studies have shown that there is an alternative form of cell death – autophagy. Since apoptosis in T-cells of patients with asthma is reduced, we suggested that autophagy could be initiated. The aim of the study is to perform a comparative analysis of the expression of apoptosis and autophagy key proteins in T-lymphocytes of patients with mild and severe bronchial asthma.

To achieve this aim, the Western blot method was applied. The results were processed with the help of R statistics. Boxplots were used to present the data.

We showed that in the group with mild asthma the amount of caspase-3 increases during cultivation (spontaneous apoptosis is activated). In the group with the severe form, its content did not change.

Autophagy activation was assessed by the presence of LC3-II protein. The results showed that form II of LC3-protein is present only in the group with the severe form. Therefore, the analysis of the content of key proteins of autophagy – Rubicon and UVRAG – in the cells of this category of patients was carried out and a significantly increased expression of these proteins was detected. In addition, we found a significant increase of UVRAG compared with Rubicon.

Thus, inhibition of apoptosis is characteristic of T-lymphocytes of patients with bronchial asthma. However, in the mild group, a decrease of nutrients in the culture medium stimulated the launch of apoptosis, which was manifested in an increase in the content of caspase-3 and a decrease in Bcl-2. In the severe group, cell cultivation did not cause an increase in apoptotic activity, autophagy was activated instead, and we assume that for this group of patients it is an alternative way of cell death.

Keywords: bronchial asthma, T-lymphocytes, apoptosis, autophagy, caspase-3, Bcl-2, LC3B, Rubicon, UVRAG

Acknowledgments. This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 18-34-00739).

Figure Captions

- Fig. 1. Assessment of the content of procaspase-3 and of caspase-3, its active form, in T-lymphocytes lysates following three and six days of culturing. The immunograms show control lysates of the cells and lysate samples obtained from the cells of patients with the mild and severe forms of atopic asthma. β -actin was used as “loading” control. The content of caspase-3 and procaspase-3 in different cell lysates was normalized with regard to the β -actin level.
- Fig. 2. Statistical analysis of the data on caspase-3 and its inactive form expression in T-lymphocytes from healthy donors and patients with the mild and severe forms of asthma. The analysis was performed in freshly isolated cells, as well as in cells cultured for three and six days: *a*) intergroup analysis of the coefficient k in three groups using the Kruskal–Wallis test followed by paired comparisons with the Bonferroni and Benjamini–Hockberg correction; *b*) analysis of the coefficient k in the control group in dynamics (0, 3, and 6 days); *c*) analysis of the coefficient k in the group with the mild form of atopic asthma in dynamics (0, 3, and 6 days); *d*) analysis of the coefficient k in the group with severe atopic asthma in dynamics (0, 3, and 6 days).
- Fig. 3. Analysis of the Bcl-2 content in T-lymphocytes lysates following three and six days of culturing by the method of Western blotting. The immunograms show control lysates of the cells and lysate samples obtained from the cells of patients with mild and severe forms of atopic asthma. GAPDH was used as “loading” control.
- Fig. 4. Analysis of the content of LC3-I and -II proteins in T-lymphocytes lysates following three and six days of culturing by the method of Western blotting. The immunograms show control lysates of the cells and lysate samples obtained from the cells of patients with the mild and severe forms of atopic asthma. β -actin was used as “loading” control. The content of caspase-3 and procaspase-3 in different cell lysates was normalized to the β -actin level.
- Fig. 5. Statistical analysis of the data on Rubicon (*a*) and UVRAG (*b*) in T-lymphocytes from healthy donors and patients with the severe form of asthma. The analysis was performed in freshly isolated cells. Boxplots were used to present the data. The comparison was carried out with the help of the Wilcoxon test.
- Fig. 6. Comparative analysis of the content of Rubicon and UVRAG proteins in T-lymphocytes of patients with the severe form of asthma. The analysis was performed in freshly isolated cells. Boxplots were used to present the data. The comparison was carried out with the help of the Wilcoxon test.

References

1. Jyothula S.S., Eissa N.T. Autophagy and role in asthma. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2013, vol. 19, no. 1, pp. 30–35. doi: 10.1097/MCP.0b013e32835b1150.
2. Potapinska O., Demkow U. T lymphocyte apoptosis in asthma. *Eur. J. Med. Res.*, 2009, vol. 14, suppl. IV, pp. 192–195. doi: 10.1186/2047-783X-14-S4-192.

3. Walsh G.M. Eosinophil apoptosis and clearance in asthma. *J. Cell Death*, 2013, vol. 6, pp. 17–25. doi: 10.4137/JCD.S10818.
4. Novershtern N., Itzhaki Z., Manor O., Friedman N., Kaminski N. A functional and regulatory map of asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2008, vol. 38, pp. 324–336. doi: 10.1165/rcmb.2007-0151OC.
5. Holtzman M.J., Green J.M., Jayaraman S., Arch R.H. Regulation of T cell apoptosis. *Apoptosis*, 2000, vol. 5, no. 5, pp. 459–471. doi: 10.1023/a:1009657321461.
6. Yuan J., Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev.*, 2010, vol. 24, no. 23, pp. 2592–2602. doi: 10.1101/gad.1984410.
7. Klionsky D.J. The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J. Cell Sci.*, 2005, vol. 118, pt. 1, pp. 7–18. doi: 10.1242/jcs.01620.
8. Yu L., Chen Y., Tooze S.A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 2018, vol. 14, no. 2, pp. 207–215. doi: 10.1080/15548627.2017.1378838.
9. Loos B., Engelbrecht A.M., Lockshin R.A., Klionsky D.J., Zakeri Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy*, 2013, vol. 9, no. 9, pp. 1270–1285. doi: 10.4161/auto.25560.
10. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Akitsugu Y., Takayoshi K., Takeshi N., Eiki K., Yoshinori O., Tamotsu O. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J.*, 2000, vol. 19, no. 21, pp. 5720–5728. doi: 10.1093/emboj/19.21.5720.
11. Tanida I., Ueno T., Kominami E. LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.*, 2008, vol. 445, pp. 77–88. doi: 10.1007/978-1-59745-157-4_4.
12. Yoshii S.R., Mizushima N. Monitoring and measuring autophagy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 9, art. 1865, pp. 1–13. doi: 10.3390/ijms18091865.
13. Jiang P., Mizushima N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods*, 2015, vol. 75, pp. 13–18. doi: 10.1016/j.jymeth.2014.11.021.
14. Klionsky D.J., Abdalla F.C., Abeliovich H., Eskelinen E-L. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, 2016, vol. 8, no. 4, pp. 445–544. doi: 10.4161/auto.19496.
15. Itakura E., Kishi C., Inoue K., Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol. Biol. Cell.*, 2008, vol. 19, no. 12, pp. 5360–5372. doi: 10.1091/mbc.E08-01-0080.
16. Zhong Y., Wang Q.J., Li X., Yan Y., Backer J.M., Chait B.T., Heintz N., Yue Z. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.*, 2009, vol. 11, no. 4, pp. 468–476. doi: 10.1038/ncb1854.
17. Matsunaga K., Saitoh T., Tabata K., Omori H., Satoh T., Kurotori N., Maejima I., Shirahama-Noda K., Ichimura T., Isobe T., Akira S., Noda T., Yoshimori T. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat. Cell Biol.*, 2009, vol. 11, no. 4, pp. 385–396. doi: 10.1038/ncb1846.
18. Funderburk S.F., Wang Q.J., Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex – at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.*, 2010, vol. 20, no. 6, pp. 355–362. doi: 10.1016/j.tcb.2010.03.002.
19. Mamontova T.V., Kaydashev I.P. New aspects of mononuclear cells apoptosis in atopic asthma pathogenesis. *Allergologiya*, 2005, no. 4, pp. 15–23. (In Russian)
20. Grzegorzczak J., Kowalski M. L., Pilat A., Iwaszkiewicz J. Increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with perennial allergic asthma/rhinitis: relation to serum markers of apoptosis. *Mediators Inflammation*, 2002, vol. 1, no. 4, pp. 225–233. doi: 10.1080/09629350290000087.
21. Boychuk S.V., Mustafin I.G., Fassakhov R.S. Mechanisms of peripheral blood lymphocytes apoptosis in patients with atopic bronchial asthma. *Allergologiya*, 2001, no. 1, pp. 3–9. (In Russian)
22. Lamb J. P., James A., Carroll N., Siena L., Elliot J., Vignola A. M. Reduced apoptosis of memory T-cells in the inner airway wall of mild and severe asthma. *Eur. Resp. J.*, 2005, vol. 26, no. 2, pp. 265–270. doi: 10.1183/09031936.05.00144304.
23. Hamzaoui A., Hamzaoui K., Salah H., Chabbou A. Lymphocytes apoptosis in patients with acute exacerbation of asthma. *Mediators Inflammation*, 1999, vol. 8, nos. 4–5, pp. 237–243. doi: 10.1080/09629359990405.

24. Ying S., Khan L.N., Meng Q., Barnes N.C., Kay A.B. Cyclosporin A, apoptosis of BAL T-cells and expression of Bcl-2 in asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 2003, vol. 22, no. 2, pp. 207–212. doi: 10.1183/09031936.03.00098902.
25. Abdulmir A.S., Hafidh R.R., Abubakar F., Abbas K.A. Changing survival, memory cell compartment, and T-helper balance of lymphocytes between severe and mild asthma. *BMC Immunol.*, 2008, vol. 16, art. 73, pp. 1–10. doi: 10.1186/1471-2172-9-73.
26. Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, vol. 8, no. 9, pp. 741–752. doi: 10.1038/nrm2239.
27. Marino G., Niso-Santano M., Baehrecke E.H., Kroemer G. Self-consumption: The interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2014, vol. 15, no. 2, pp. 81–94. doi: 10.1038/nrm3735.
28. Martin L.J., Gupta J., Jyothula S.S., Butsch Kovacic M., Biagini Myers J.M., Patterson T.L., Erickson M.B., He H., Gibson A.M., Baye T.M., Amirsetty S., Tsoras A.M., Sha Y., Eissa N.T., Hershey G.K. Functional variant in the autophagy-related 5 gene promoter is associated with childhood asthma. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 4, art. e33454, pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0033454.
29. Ban G.Y., Pham D.L., Trinh H.K., Lee S.I., Suh D.H., Yang E.M., Ye Y.M., Shin Y.S., Chwae Y.J., Park H.S. Autophagy mechanisms in sputum and peripheral blood cells of patients with severe asthma: A new therapeutic target. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, vol. 46, no. 1, pp. 48–59. doi: 10.1111/cea.12585.
30. Liu J.N., Suh D.H., Trinh H.K., Chwae Y.J., Park H.S., Shin Y.S. The role of autophagy in allergic inflammation: A new target for severe asthma. *Exp. Mol. Med.*, 2016, vol. 48, no. 7, art. e243, pp. 1–10. doi:10.1038/emmm.2016.38.
31. Poon A.H., Chouiali F., Tse S.M., Litonjua A.A., Hussain S.N., Bagloli C.J., Eidelman D.H., Olivenstein R., Martin J.G., Weiss S.T., Hamid Q., Laprise C. Genetic and histologic evidence for autophagy in asthma pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, vol. 129, no. 2, pp. 569–571. doi: 10.1016/j.jaci.2011.09.035.
32. Liang C., Feng P., Ku B., Dotan I., Canaani D., Oh B.H., Jung J.U. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.*, 2006, vol. 8, no. 7, pp. 688–699. doi: 10.1038/ncb1426.
33. Liang C., Lee J.S., Inn K.S., Gack M.U., Li Q., Roberts E.A., Vergne I., Deretic V., Feng P., Akazawa C., Jung J.U. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.*, 2008, vol. 10, no. 7, pp. 776–787. doi: 10.1038/ncb1740.
34. Sun Q., Zhang J., Fan W., Wong K.N., Ding X., Chen S., Zhong Q. The RUN domain of Rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression. *J. Biol. Chem.*, 2011, vol. 286, no. 1, pp. 185–191. doi: 10.1074/jbc.M110.126425.

Для цитирования: Скибо Ю.В., Тихомирова М.В., Абрамов С.Н., Биктагирова Э.М., Решетникова И.Д., Акберова Н.И., Абрамова З.И. Анализ экспрессии ключевых белков-регуляторов апоптоза и аутофагии в Т-лимфоцитах больных бронхиальной астмой // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 4. – С. 505–520. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.4.505-520.

For citation: Skibo Yu.V., Tikhomirova M.V., Abramov S.N., Biktagirova E.M., Reshetnikova I.D., Akberova N.I., Abramova Z.I. Analysis of the expression of key protein regulators of apoptosis and autophagy in T-lymphocytes of patients with bronchial asthma. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 4, pp. 505–520. doi: 10.26907/2542-064X.2019.4.505-520. (In Russian)