

УДК 577.2:616-006:615.277

ШАПЕРОН HSP70 МОДУЛИРУЕТ ПУТИ ЭНДОЦИТОЗА КЛЕТОК RAW264.7 ПРИ LPS-ИНДУЦИРОВАННОЙ АКТИВАЦИИ

¹Юринская М.М., ²Евгеньев М.Б., ¹Афанасьев В.Н., ¹Винокуров М.Г.

¹Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Пуцино, e-mail: mg-vinokurov@mail.ru;

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва

В патогенезе различных заболеваний важная роль принадлежит компонентам грамотрицательных бактерий – липополисахаридам (LPS). Поступая в кровь, LPS активируют различные клетки врожденного иммунитета человека, связываясь с TLR4 мембранными рецепторами. Основными клетками-мишенями LPS являются фагоциты, в том числе и макрофаги. Связываясь с TLR4 рецептором, LPS вызывают активацию клеток, проявляющуюся увеличением продукции активных форм кислорода, оксида азота, фактора некроза опухоли, провоспалительных цитокинов клетками. Поступление LPS в клетки осуществляется в основном эндоцитозом, зависимым от клеточных рецепторов. В ранее проведенных исследованиях показано, что экзогенный человеческий рекомбинантный белок теплового шока Hsp70 защищает разные типы клеток от их активации LPS, уменьшая LPS-индуцированную продукцию АФК, TNF α и NO нейтрофилами и снижает LPS-индуцированный апоптоз в клетках нейробластомы. В настоящее время известны различные пути эндоцитоза в клетки. В статье исследовано воздействие шаперона Hsp70 (при его экстраклеточном применении) на различные пути эндоцитоза LPS в макрофаги RAW264.7. С использованием специфических ингибиторов разных путей эндоцитоза показано, что в механизме защиты клеток белком Hsp70 от LPS-вызванной активации клеток принимают участие рецептор-опосредованный эндоцитоз, пиноцитоз, а также механизмы эндоцитоза с участием клатрина, кавеолина и тубулина.

Ключевые слова: эндоцитоз, шаперон Hsp70, макрофаги RAW264.7

CHAPERONE HSP70 MODULES THE PATHWAY OF RAW264.7 CELL ENDOCYTOSIS OF AT LPS-INDUCED ACTIVATION

¹Yurinskaya M.M., ²Evgenyev M.B., ¹Afanasev V.N., ¹Vinokurov M.G.

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Puschino, e-mail: mg-vinokurov@mail.ru;

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

In the pathogenesis of various diseases, an important role belongs to the components of gram-negative bacteria – lipopolysaccharides (LPS). Entering the blood, LPS activate various cells of human innate immunity by binding to TLR4 membrane receptors. The main target cells of LPS are phagocytes, including macrophages. By binding to the TLR4 receptor, LPS induce cell activation, manifested by an increase in the production of reactive oxygen species, nitric oxide, tumor necrosis factor, and proinflammatory cytokines by cells. The entry of LPS into cells is carried out mainly by endocytosis, dependent on cell receptors. Previous studies have shown that exogenous human recombinant heat shock protein Hsp70 protects different types of cells from their LPS activation by decreasing LPS-induced production of ROS, TNF α and NO by neutrophils and reducing LPS-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Currently, various pathways of endocytosis into cells are known. The article investigated the effect of the Hsp70 chaperone (with its extracellular application) on various pathways of LPS endocytosis in RAW264.7 macrophages. Using specific inhibitors of different pathways of endocytosis, it was shown that receptor-mediated endocytosis, pinocytosis, as well as mechanisms of endocytosis involving clathrin, caveolin, and tubulin are involved in the mechanism of cell protection by the Hsp70 protein from LPS-induced cell activation.

Keywords: endocytosis, chaperone Hsp70, macrophages RAW264.7

Эндотоксины (липополисахариды (LPS)) – термостабильные компоненты наружной части клеточной мембраны грамотрицательных микроорганизмов микробиоты человека. Поступая в кровь из кишечника (при эндотоксемии), эндотоксины участвуют в патогенезе грамотрицательного сепсиса, метаболического синдрома, диабета типа 2, почечной недостаточности, сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и других заболеваний [1, 2]. Основными клетками-мишенями эндотоксинов являются циркулирующие в кровяном русле нейтрофилы

и моноциты, а также макрофаги, дифференцирующиеся из моноцитов в различных тканях организма человека и животных. Макрофаги в организме при воспалительных процессах выполняют различные функции, такие как презентация антигена, фагоцитоз, синтез и секреция различных медиаторов воспаления. Активация клеток-мишеней липополисахаридами происходит при связывании LPS с TLR4 рецептором. Этой активации предшествует последовательность реакций, которые начинаются LPS-связывающим белком (LBP), извлекающим молекулу LPS

из липополисахаридных мицелл, находящихся в кровяном русле. Далее LPS доставляет молекулу LPS к мембранному гликопротеину CD14 макрофагов, который передает LPS MD2 белку. Затем образуются два комплекса, состоящие из LPS, MD2 и TLR4. После их агрегации образуется гетеродимерный рецепторный комплекс [MD2-LPS-TLR4]₂. Для активации клеток регуляторные сигналы от упомянутого рецепторного комплекса через различные пути трансдукции сигналов передаются к ядерным факторам транскрипции клеток [2]. После активации под действием LPS макрофаги секретируют провоспалительные цитокины (IL-1, 1β, 2, 6, 8), фактор некроза опухолей TNFα, генерируют оксид азота (NO) и активные формы кислорода (АФК). Под действием LPS происходит увеличение экспрессии ряда клеточных генов, включая индуцибельную синтазу оксида азота (iNOS), TNFα, рецепторов LPS (TLR4) и других белков [3]. В предыдущих наших работах было опубликовано, что экзогенный Hsp70 защищает разные типы клеток от их активации LPS, уменьшая LPS-индуцированную продукцию АФК, NO, TNFα [4, 5]. В настоящее время известны различные пути эндоцитоза в клетки [6]. Известно, что LPS поступают в клетки-мишени с помощью рецептор-зависимого эндоцитоза [2], а Hsp70 – с помощью клатрин-независимого эндоцитоза [7]. В связи с этим представляет интерес исследовать действие шаперона Hsp70 на различные пути эндоцитоза LPS в клетки.

Цель исследования – определить отдельные пути эндоцитоза шаперона Hsp70 и сравнить их с путями эндоцитоза LPS в клетки RAW264.7.

Материалы и методы исследования

Культуры клеток. Клетки мышинных макрофагов RAW264.7 были получены из American type culture collection. Клетки L-929 (мышинные фибробласты) получены из Российской коллекции клеточных культур (ИНЦ РАН). Клетки RAW264.7 и L-929 выращивали в культуральной среде (КС) DMEM (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, которая была проверена на присутствие эндотоксина (0,01 ед/мл) («HyClone», США), содержала 2 mM L-глутамин и стандартный набор антибиотиков. Клетки выращивали в CO₂-инкубаторе при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Получение Hsp70. Использовали рекомбинантный человеческий Hsp70 (очищенный от LPS), экспрессированный в клетках *Spodoptera frugiperda* согласно [4].

Производство фактора некроза опухолей TNFα клетками RAW264.7 определяли по цитотоксическому действию образцов на клетки-мишени [5].

Производство оксида азота NO клетками измеряли с использованием реактива Грисса [4] (Sigma-Aldrich, США).

Производство активных форм кислорода (АФК) клетками RAW264.7 измеряли с использованием красителя нитросинего тетразолия НСТ [5].

Эксперименты с использованием ингибиторов. Ингибиторы эндоцитоза добавляли к клеткам за 30 мин до добавления белка Hsp70. В работе были использованы следующие ингибиторы: динасор – ингибитор клатрин-опосредованного эндоцитоза, амилорид – ингибитор макропиноцитоза, филиппин – ингибитор кавеолин-зависимого эндоцитоза, нокодазол – ингибитор тубулин-зависимого эндоцитоза, метил-бета-циклодекстрин – ингибитор липидных микродоменов. В ходе предварительных экспериментов и полученной концентрационной зависимости были определены оптимальные и нетоксичные концентрации используемых ингибиторов (данные не представлены).

Клетки RAW264.7 собирали с использованием скреперов фирмы Sarstedt (Германия), отмывали в полной КС, подсчитывали и разводили КС, содержащей 10% ЭТС, до требуемой концентрации, рассеивали в 24-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч при 37 °C и 5% CO₂. Заменяли КС на свежую, добавляли ингибиторы эндоцитоза на 30 мин, делали добавки Hsp70 на 2 ч, затем добавляли LPS и инкубировали клетки в течение 24 ч при 37 °C и 5% CO₂. Выбранная схема проведения экспериментов позволяла определять продукцию активных форм кислорода, оксида азота и фактора некроза опухолей в одних и тех же опытных пробах.

Статистика

Все эксперименты с клетками проводились в четырех повторностях. Результаты анализировали с помощью программы SigmaPlot. Различия между группами были проанализированы с помощью дисперсионного анализа ANOVA (Shapiro-Wilk's test, $p < 0,05$). Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение в четырех независимых экспериментах, выполненных в виде четырехкратных повторностей.

Результаты исследования и их обсуждение

Полученные результаты (рис. 1–3) показали, что все использованные ингибиторы снижали продукцию АФК, NO и TNFα, ак-

тивированную LPS. Hsp70 защищал клетки от действия LPS (рис. 1–3, столбики CM, 2), уменьшая продукцию АФК, NO и TNF α (рис. 1–3, столбики CM, 3). Для сравнительного анализа путей эндоцитоза LPS с путями эндоцитоза шаперона Hsp70 в присутствии ингибиторов эндоцитоза мы рассчитывали отношение продукции АФК, NO, TNF α в пробах с LPS (рис. 1–3, столбики CM, 2) (n1) к образованию измеряемых соединений в образцах с (Hsp70 + LPS) (рис. 1–3, столбики CM, 3) (n2). Для продукции АФК (рис. 1) эти величины (n1/n2) равны, соответственно, 2 и 1.2. Исходя из этих расчетов и данных рисунков видно, что ингибиторы амилорид, динасор, MbCD и нокодазол практически полностью отменяли защиту клеток Hsp70 от образования АФК под действием LPS (рис. 1), сравнение столбиков 2 и 3. Филлипин несколько снижал защитное действие Hsp70 (рис. 1, Fil, 3). Действие динасора на продукцию NO (рис. 2) было подобно ингибированию продукции АФК (рис. 1, Дун, 3). Динасор продемонстрировал практически полную отмену защитного действия Hsp70 при регистрации продукции оксида азота клетками (рис. 2). Все остальные ингибиторы отменяли защиту Hsp70 не полностью. Менее эффективным был амилорид (рис. 2). Действие ингибиторов эндоцитоза на продукцию клетками TNF α , показало, что амилорид, динасор и нокодазол блокировали защитное действие Hsp70.

При активации липополисахаридами TLR4 рецептора макрофагов продуцируемый клетками TNF α может связываться с рецепторами TNF α этих клеток. В результате этого в клетках активируется сборка NOX2 и, как следствие, происходит значительное увеличение продукции АФК клетками [8]. В функционировании НАДФН-оксидазы важную роль играют липидные микродомены, разрушение которых MbCD снижает продукцию АФК клетками [9], как и показывают наши экспериментальные данные (рис. 1, MbCD, 2, 3). В липидных микродоменах функционируют рецепторы TNF α и LPS [10]. Ингибитор липидных микродоменов – MbCD снижает уровень секреции TNF α и NO макрофагами (рис. 2 и 3, MbCD, столбики 2 и 3). Поэтому снижение защиты клеток от LPS белком Hsp70, по-видимому, связано с разрушением липидных микродоменов MbCD и, как следствие уменьшением проникновения Hsp70 в клетки и снижением эффективности его защиты. Полученные нами данные по действию MbCD подтверждаются результатами о механизмах внутриклеточной регуляции воспалительного ответа клеток на LPS Установлено, что активация TLR4 рецепторов запускает

два сигнальных пути: MyD88-зависимого и TRIF-зависимого. Эти сигнальные пути приводят к производству провоспалительных цитокинов. MyD88- и TRIF-зависимые сигнальные пути запускаются последовательно и связаны с перераспределением LPS-активированного TLR4 из плазматической мембраны в эндосомы. Транслокация TLR4 внутрь клетки происходит в эндосомах, и его дальнейшая лизосомная деградация способствует прекращению воспалительного ответа [2]. LPS-индуцированные MyD88-зависимые сигнальные пути оказывают модулирующее действие на клеточный метаболизм. Было показано, что TRAF6 активирует киназу Akt, приводя к быстрому усилению гликолиза. Гликолиз, стимулированный LPS, и последующий синтез ацетил-КоА жирных кислот *de novo* может способствовать ацетилированию гистонов, необходимому для транскрипции и расширения эндоплазматической сети и аппарата Гольджи и также необходим для интенсивной выработки и секреции цитокинов [2].

Различные белки поступают в клетки преимущественно за счет клатринзависимого эндоцитоза [11]. В наших экспериментах динасор – ингибитор клатринзависимого эндоцитоза – существенно снижал активированную LPS продукцию АФК, NO и TNF α клетками RAW264.7, а также снижал защитное действие Hsp70 (рис. 1–3, столбики 3). Обнаруженное в экспериментах уменьшение продукции АФК, NO и TNF α клетками связано со снижением встраивания рецепторов CD14 и TLR4 в мембрану RAW264.7 [11]. Уменьшение генерации и TNF α в присутствии данного ингибитора (рис. 1, 3) обусловлено ингибированием НАДФН-оксидазы [12]. Снижение защитного действия Hsp70 динасором связано с уменьшением содержания в клеточной мембране TLR4 рецептора.

Известно, что амилорид является модулятором протон-активируемых каналов клетках, он блокирует продукцию провоспалительных цитокинов, индуцированную LPS [13]. В наших экспериментах амилорид эффективно снижал LPS-активированную продукцию АФК, NO и TNF α (рис. 1–3): величина n1/n2 составила 1,09; 1,57 и 1,24 для АФК, NO и TNF α , соответственно. Амилорид ингибирует активность Na⁺/H⁺-обменника и вызывает снижение LPS-индуцированной активации НАДФН-оксидазы. Ингибирование Na⁺/H⁺-обменника снижает продукцию TNF α макрофагами. Hsp70 может связываться с Na⁺/H⁺-обменником. С этим связано снижение защиты белком клеток RAW264.7 от действия LPS [13].

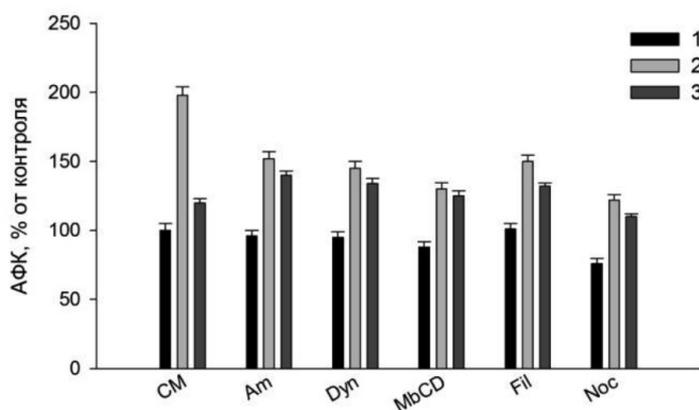


Рис. 1. Действие ингибиторов эндоцитоза на генерацию АФК в клетках RAW264.7 в присутствии Hsp70 (1 мкг/мл) и LPS (1 мкг/мл). CM – культуральная среда; Am – 100 мкМ амилорид; Dyn – 40 мкМ динасор; MbCD – 2 мМ метил-β-циклодекстрин; Fil – 1 мкМ филипин; Noc – 1 мкМ нокодазол. 1 – CM; 2 – добавление LPS; 3 – добавление Hsp70 и через 2 ч LPS. Уровень АФК в контроле равен 100%, остальные величины – проценты от контроля

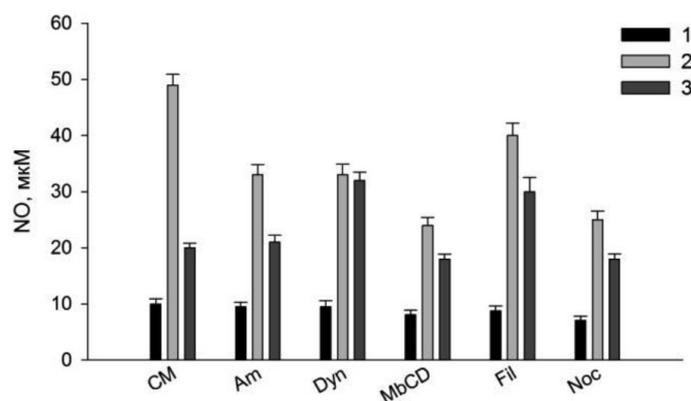


Рис. 2. Продукция оксида азота (NO) клетками RAW264.7 при действии ингибиторов эндоцитоза в присутствии Hsp70 и LPS. Обозначения и условия эксперимента как на рис. 1

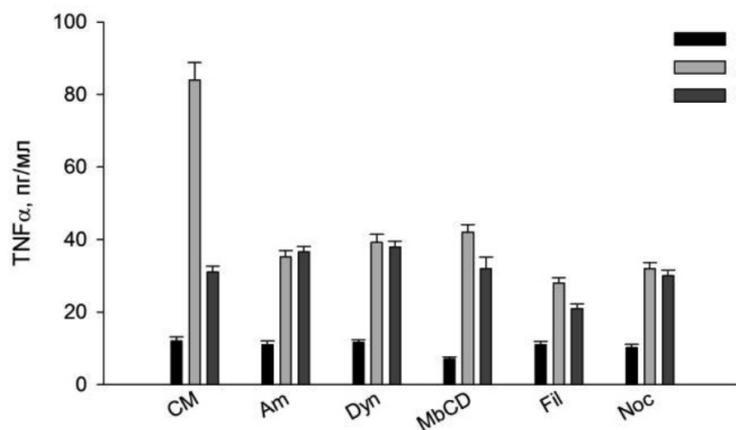


Рис. 3. Влияние ингибиторов эндоцитоза на продукцию TNFα клетками RAW264.7 в присутствии Hsp70 и LPS. Обозначения и условия эксперимента как на рис. 1

Тубулины играют важную роль в воспалительном ответе макрофагов на липополисахариды, в частности регулируют LPS-индуцированную активацию макрофагов через сигнальный путь MAPK/p38 [14]. Пути внутриклеточной сигнализации с участием митогенактивированных киназ и p38MAPK участвуют в регуляции продукции АФК, NO и TNF α [2]. В наших экспериментах нокодазол (ингибитор тубулин-зависимого эндоцитоза) снижал образование АФК, NO, TNF α клетками. Снижение нокодазолом защитного действия Hsp70 обусловлено, по-видимому, воздействием этого ингибитора эндоцитоза на TLR4-зависимые пути внутриклеточной сигнализации клеток RAW264.7 [14].

Кавеолинзависимый эндоцитоз занимает важное место среди других механизмов эндоцитоза [15]. Кавеолы небольшие колбообразные впячивания плазматической мембраны участвуют во множестве клеточных процессов, среди которых – мембранный транспорт и формирование клеточного ответа на внешний сигнал. В них содержится белок – кавеолин, липиды (холестерин и сфинголипиды), мембранные рецепторы, синтаза оксида азота Филиппин – ингибитор кавеол-зависимого эндоцитоза – в наших экспериментах снижал величину n1/n2, которая составила для генерации АФК-1,14 и 1,33 для секреции оксида азота и TNF α .

Заключение

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что человеческий рекомбинантный белок Hsp70 снижает LPS-активированную продукцию АФК, NO, TNF α . Проведенный ингибиторный анализ показал, что защита клеток RAW264.7 LPS-активированной продукции АФК, NO, TNF α экзогенным белком Hsp70 осуществляется с участием кавеолин-, тубулин-, клатрин- и рецепторзависимого эндоцитоза, а также в этом механизме участвует пиноцитоз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00109).

Список литературы

1. Munford R.S. Endotoxemia-menace, marker, or mistake? Journal of Leukocyte Biology. 2016. Vol. 100. No 4. P. 687–698.

2. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. Cellular and Molecular Life Sciences. 2021. Vol. 78. No 4. P. 1233–1261.

3. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaceli S.A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J.T., Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. Journal of Cellular Physiology. 2018. Vol. 233. No. 9. P. 6425–6440.

4. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatssepina O., Garbuz D., Karpov V., Surkov S., Murashev A., Ostrov V., Margulis B., Evgen'ev M., Vinokurov M. Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. Annals of the New York Academy of Sciences. 2010. Vol. 1197. P. 94–107.

5. Yurinskaya M.M., Kochetkova O.Y., Shabarchina L.I., Antonova O.Y., Suslikov A.V., Evgen'ev M.B., Vinokurov M.G. Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes. Cell Stress Chaperones. 2017. Vol. 22. No 1. P. 163–171.

6. Ju Y., Guo H., Edman M., Hamm-Alvarez S.F. Application of advances in endocytosis and membrane trafficking to drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews. 2020. Vol. 157. P. 118–141.

7. Nimmervoll B., Chtcheglova L. A., Juhasz K., Cremades N., Aprile F. A., Sonleitner A., Hinterdorfer P., Vigh L., Preiner J., Balogi Z. Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. 2015. FEBS Letters. Vol. 589 (19, Pt B).

8. Lee D., Ding Y., Jayaraman A., Kwon J.S. Mathematical modeling and parameter estimation of intracellular signaling pathway: application to LPS-induced NF κ B activation and TNF α production in macrophages. Processes. 2018. Vol. 6. No. 3. P. 21.

9. Jin S., Zhou F., Katirai F., Li P.L. (2011) Lipid raft redox signaling: molecular mechanisms in health and disease. Antioxidants & Redox Signaling. 2011. Vol. 15. No. 4. P. 1043–1083.

10. Sviridov D., Mukhamedova N., Miller Y.I. Lipid rafts as a therapeutic target. Journal of Lipid Research. 2020. Vol. 61. No. 5. P. 687–695.

11. Józefowski S., Śróttek M. Lipid raft-dependent endocytosis negatively regulates responsiveness of J774 macrophage-like cells to LPS by down regulating the cell surface expression of LPS receptors. Cellular Immunology. 2017. Vol. 312. P. 42–50.

12. Lamb F.S., Hook J.S., Hilkin B.M., Huber J.N., Volk A.P., Moreland J.G. Endotoxin priming of neutrophils requires endocytosis and NADPH oxidase-dependent endosomal reactive oxygen species. The Journal of Biological Chemistry. 2012. Vol. 287. No. 15. P. 12395–12404.

13. Zhang Y. He H., Zhang B., Chen Q., Yao S., Gui P. Amelioration of Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Rats by Na-H Exchanger-1 Inhibitor Amiloride Is Associated with Reversal of ERK Mitogen-Activated Protein Kinase. BioMed Research International. 2018. Vol. 2018:3560234.

14. Bian H., Li F., Wang W., Zhao Q., Gao S., Ma J., Li X., Ren W., Qin C., Qi J. MAPK/p38 regulation of cytoskeleton rearrangement accelerates induction of macrophage activation by TLR4, but not TLR3. International Journal of Molecular Medicine. 2017. Vol. 40. No. 5. P. 1495–1503.

15. Muriel O., Sánchez-Álvarez M., Strippoli R., Del Pozo M.A. Role of the endocytosis of caveolae in intracellular signaling and metabolism. Progress in molecular and subcellular biology. 2018. Vol. 57. P. 203–234.