

УДК 577.218

ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЧЕЛОВЕЧЕСКИЙ БЕЛОК ТЕПЛООВОГО ШОКА БТШ70 ВЛИЯЕТ НА ИЗМЕНЕНИЕ СПЕКТРА БЕЛКОВ ПРИ АКТИВАЦИИ МАКРОФАГОВ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТОКСИНОМ

© 2011 г. Е. А. Рожкова¹, О. Г. Зацепина¹, М. М. Юринская², М. Г. Винокуров², М. Б. Евгеньев^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

²Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Московская обл., 142290

Поступила в редакцию 07.09.2010 г.

Принята к печати 13.10.2010 г.

Ключевые слова: внеклеточный рекомбинантный белок теплового шока 70 кДа, липополисахариды, макрофаги, двумерный электрофорез.

THE EFFECT OF EXTRACELLULAR RECOMBINANT HUMAN HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP70) ON PROTEIN PATTERN OBSERVED AFTER ENDOTOXIN-INDUCED MACROPHAGE ACTIVATION, by E. A. Rozhkova¹, O. G. Zatepina¹, M. M. Yurinskaya², M. G. Vinokurov², M. B. Evgen'ev^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: misha572001@yahoo.com; ²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia). The protein pattern of mouse macrophage strain (J774) has been investigated using 2D electrophoresis after combined action of bacterial endotoxins (LPS), heat shock treatment (HS) and administration of recombinant human Hsp70. The investigation demonstrated significant protective effect of HS and recombinant Hsp70 treatment applied before LPS introduction. This effect is apparently realized by means of several signal transduction systems. In the course of the investigation, we have identified eight proteins, which exhibited pronounced changes in their synthesis due to combined treatment. The data accumulated may shed light on molecular mechanisms underlying protective antiseptic action of HS and/or recombinant Hsp70 applied before LPS administration.

Keywords: extracellular heat shock protein 70, bacterial lipopolysaccharide, macrophages, 2D electrophoresis.

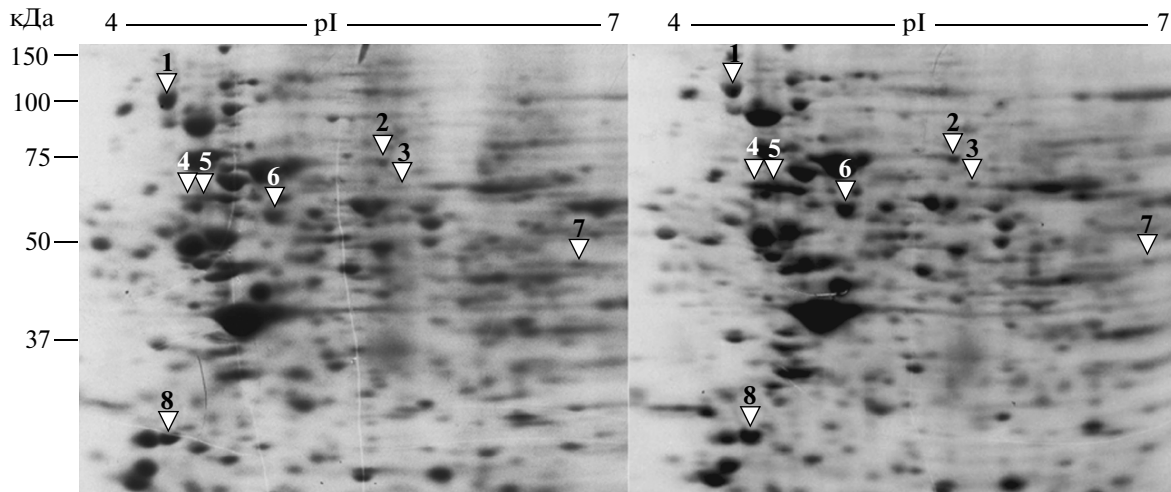
В настоящее время сепсис считается одной из наиболее сложных и недостаточно изученных проблем медицины. Несмотря на значительные успехи в выяснении механизмов его развития, сепсис остается главной причиной смерти в палатах интенсивной терапии [1]. При этом в 45–60% случаев сепсис вызывается грамотрицательными бактериями и в 65–70% случаев становится причиной септического шока [2]. Основную роль в иницировании ответа организма на вторжение грамотрицательных бактерий играют липополисахариды (ЛПС) бактериальной стенки (эндотоксины) [3, 4]. При массивном попадании бактерий в организм возможно развитие чрезмерного ответа, при котором возникают различные нарушения как на клеточном, так и на физиологическом уровне. В результате может развиваться эндотоксический шок [5], зачастую приводящий к летальному исходу.

У многих организмов, включая млекопитающих, важными стрессовыми белками являются белки теплового шока, в частности БТШ70 [6]. За послед-

ние годы опубликованы новые данные о том, что БТШ70 может находиться во внеклеточном пространстве, функционируя как специализированные сигнальные молекулы – цитокины [7]. Появление внеклеточного БТШ70 вызывает активацию различных звеньев иммунной системы, воспринимаемая ею как сигнал “опасности” [8]. Это приводит к усилению продукции цитокинов, повышению скорости фагоцитоза и активации системы комплемента, что увеличивает потенциал БТШ70 как противовоспалительного фактора. Следует отметить, что данные эффекты вызывает как белок, высвобождаемый из клеток во внеклеточное пространство, так и экзогенный БТШ70 [9]. Это может быть важным для терапевтического применения БТШ70.

Ранее мы наблюдали защитный эффект предварительного введения различных препаратов БТШ70 (рекомбинантного человеческого и выделенного из сердечной мышцы верблюда) как на уровне целого организма, так и на уровне клеток (нейтрофилов человека и макрофагов мыши) [10]. Чтобы посмотреть, что происходит в клетках на молекулярном уровне, было интересно сравнить об-

* Эл. почта: misha572001@yahoo.com



Двумерный электрофорез клеток J774, меченных ^{35}S -метионином. *a* – Контрольные клетки, культивируемые при 37°C . *b* – Клетки, обработанные БТШ70, перед воздействием ЛПС при 37°C . 1 – Grp94; 2 – Trap1; 3 – Dpysl2; 4 – Sqstm1; 5 – hnRNP K; 6 – Hspd1; 7 – Eno1; 8 – Anxa5.

шие картины синтеза белков в макрофагах J774 мыши при комбинированном воздействии теплового шока, рекомбинантного БТШ70 человека, наработанного в системе экспрессии в клетках *Spodoptera frugiperda*, и ЛПС.

Цель настоящей работы – изучение молекулярных механизмов защитного действия экзогенного рекомбинантного БТШ70 человека в модели эндотоксемии, вызванной введением ЛПС (*Escherichia coli*), на культуре макрофагов J744 мыши.

Макрофаги мыши (линия J774), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (“Sigma”) с добавлением термоинактивированной 10%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (“HyClone”, Logan UT), проверенной на присутствие эндотоксина (0.01 ед/мл), 1% пенициллина, 1% стрептомицина, 2 мМ L-глутамин при 37°C в среде, содержащей 5% CO_2 . В день опыта клетки собирали центрифугированием, определяли их количество и доводили их концентрацию свежей культуральной средой до 2×10^6 клеток/мл среды. На каждую пробу брали от 5 до 6 млн. клеток во флаконах объемом 10 мл. Тепловой шок проводили на водяной бане при $+43^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. После теплового шока в пробы добавляли БТШ70 и/или ЛПС из *E. coli* O55:B5 или O111:B4 (“Sigma”) в концентрации 1 мкг/мл. В опытах по защитному действию БТШ70 ЛПС добавляли спустя 10 мин после введения БТШ70 (при комнатной температуре). Затем все пробы культивировали при $+37^\circ\text{C}$ в течение 3 ч и снова определяли концентрацию клеток и их жизнеспособность. Каждая проба содержала 1.5×10^6 клеток, которые метили 1.85 МВк ^{35}S -метионина (“Amersham Biosci. Corp.”) в 200 мкл раствора Хенкса в течение 1 ч при $+37^\circ\text{C}$. После этого клетки отмывали в растворе Хенкса, осадок растворяли в 75 мкл

буфера О’Фаррелла, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Ген рекомбинантного БТШ70 человека для дальнейшей экспрессии клонировали под полиэдриновым промотором в бакмиду, как описано в [11]. Рекомбинантный белок, синтезированный в клетках *Spodoptera frugiperda*, очищали на смоле Ni-NTA согласно рекомендациям производителя (“QIAGEN”). Двумерный гель-электрофорез проводили согласно классическому методу О’Фаррелла [12] с некоторыми вариациями. На трубку брали 1.2×10^6 клеток и проводили изоэлектрофокусирование при 300 В в течение 16 ч. Электрофорез во втором направлении проводили в 12%-ном полиакриламидном геле. Гели окрашивали кумасси R-250, высушивали и экспонировали на рентгеновскую пленку в течение 5 дней. Пятна, соответствующие белкам, синтез которых изменился, оценивали по включению ^{35}S -метионина, вырезали из препаративного геля и гидролизовали трипсином. Образцы анализировали на масс-спектрометре MALDI TOF-TOF Ultraflex II (“Bruker”). Белки идентифицировали по “пептидному фингерпринту” при помощи программы Mascot [13] и базы данных NCBI. Уровень включения ^{35}S -метионина определяли с помощью сцинтилляционного счетчика в жидком сцинтилляторе (“MP Biomedicals Ecolume”). С этой целью белковое пятно вырезали из геля и выдерживали в 60 мкл 30%-ной перекиси водорода в течение ночи при 65°C . Полученный раствор смешивали с 5 мл жидкого сцинтиллятора и измеряли радиоактивность в сцинтилляционном счетчике (по 1 мин на пробу).

В результате проведенной работы мы обнаружили восемь внутриклеточных белков (рисунок), уровень синтеза которых значительно варьировал при действии на макрофаги J774 бактериального эндотоксина в комбинации с прекоинкубированием БТШ70 и обработкой тепловым шоком по сравне-

Обнаруженные белки и уровень их синтеза

Белок и его номер в NCBI	Роль в клетке	Наблюдаемое изменение уровня синтеза белка
Grp94, или Hsp90b1, gp96 NP_035761.1	Относится к семейству БТШ90 в эндоплазматическом ретикулуме. При клеточном стрессе повышается его уровень, что приводит к воспалительному ответу. Не синтезируется при тепловом шоке.	Значительно возрастает при обработке с ЛПС. Снижение при тепловом шоке. При введении БТШ70 до обработки ЛПС уровень падает ниже контрольного.
Trap1 (TNF receptor-associated protein 1) NP_080784.1	Митохондриальный БТШ75. Антиапоптотическая роль при разных видах стресса. Защищает клетки от окислительного стресса.	Усиление при всех воздействиях, наиболее значительное под действием ЛПС. Снижение при комбинации ЛПС с preconditionированием БТШ70.
Dpysl2 (Dihydropyrimidinase-like 2 protein), или Crmp2 NP_034085.2	Участвует в реорганизации цитоскелета, регулируя миграцию клеток. Его синтез зависит от активности клетки.	Усиление во всех пробах при тепловом шоке и при совместной обработке БТШ70 и ЛПС.
Sqstm1 (Sequestosome 1), или p62 NP_035148.1	Убиквитин-связывающий белок, который удаляет полиубиквитинированные белки из клетки. Предупреждает чрезмерный воспалительный ответ. Индуцируется в ответ на окислительный стресс.	Значительное усиление при введении как одного ЛПС, так и в комбинации с БТШ70 и тепловым шоком.
hnRNP K (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) NP_079555.1	Вовлечен во множество процессов, составляющих экспрессию генов. Служит “стыковочной платформой” для взаимодействия и объединения многих сигнальных каскадов. Фосфорилируется в ответ на внеклеточные сигналы (например, при окислительном стрессе).	Усиление в ответ на тепловой шок и на введение ЛПС. При 37°C наибольший синтез наблюдается в ответ на совместное введение БТШ70 и ЛПС.
Hspd1 NP_034607.3	Митохондриальный БТШ60. Участвует во многих видах стресса. Эндогенный БТШ60 защищает от клеточной смерти, поддерживая митохондриальное окислительное фосфорилирование. Проапоптотическая роль.	Значительное усиление в ответ на тепловой шок и совместное введение БТШ70 и ЛПС при 37°C.
Eno1 (enolase 1) NP_075608.2	Мультифункциональный белок, участвующий в гликолизе и глюконеогенезе. Регуляторная роль при многих стрессовых состояниях. Играет важную роль в организации активного цитоскелета, обеспечивая подвижность клеток в ответ на ЛПС-стимулы.	Усиление в ответ на тепловой шок и обработку ЛПС при 37°C. При введении БТШ70 до обработки ЛПС при 37°C, снижение до контрольного уровня.
Anxa5 (Annexin A5) NP_033803.1	Связывается с фосфатидилсеринем и эффективно влияет на поглощение апоптотических и некротических клеток макрофагами. Противовоспалительный эффект.	Усиление в ответ на тепловой шок и введение ЛПС. Наиболее значительное повышение в ответ на совместное введение БТШ70 и ЛПС при 37°C.

нию с уровнем в контрольных клетках (таблица). Большая часть из этих белков, а именно Hspd1, Dpysl2, Eno1, Anxa5, относятся к семействам, синтез которых изменяется при различных видах стресса, и они чаще всего обнаруживаются в протеомных исследованиях [14]. Также к общестрессовым белкам можно отнести белки теплового шока Grp94 и Trap1.

В клетке белки теплового шока, участвуя в различных сигнальных путях, могут по-разному реагировать на стресс, что отражается и в результатах нашей работы. Так, увеличение синтеза митохондриального БТШ60 (Hspd1) в основном наблюдалось в пробах, которые подвергали тепловому шоку. При этом известно, что он играет проапоптотическую роль, обеспечивая созревание прокаспазы-3 [15]. В

то же время, согласно опубликованным ранее данным [16], а также результатам нашей работы, синтез белка Grp94, локализованного в эндоплазматическом ретикулуме, не усиливается в ответ на тепловой шок. Известно, что при стрессе этот белок способен выходить во внеклеточное пространство, играя иммунорегуляторную роль [17], с чем может быть связано уменьшение его количества в клетке. Синтез Grp94 значительно индуцируется в ответ на введение ЛПС, но, что интересно, снижается при комбинированном воздействии БТШ70 и ЛПС. Еще один белок, обнаруженный нами, — Trap1, или митохондриальный БТШ75. Его синтез значительно индуцировался при введении эндотоксина, а при preconditionировании с БТШ70 перед действием ЛПС снижался. Причем такая зависимость наблю-

далась как при нормальной температуре, так и при тепловом шоке. Усиление синтеза этого белка хорошо согласуется с тем, что он защищает клетки от окислительного стресса и апоптоза, вызванного различными воздействиями [18]. С другой стороны, снижение уровня этого белка при комбинированной обработке показывает, что в этих условиях клетки, возможно, меньше подвержены стрессу.

Аннексин А5 (Anx5), белок, наиболее значительно индуцируемый при комбинированной обработке клеток БТШ70 и ЛПС, как известно, обладает противовоспалительной активностью. Этот белок функционирует как вспомогательный, способствуя поглощению апоптотических и некротических клеток макрофагами [19].

В макрофагах, обработанных эндотоксином в различных комбинациях с БТШ70 и тепловым шоком, отмечена существенная индукция белка Sqstm1. Повышение уровня этого белка в ответ на введение ЛПС наблюдали и ранее [20]. Известно, что Sqstm1 может ослаблять NF-κB-зависимый синтез провоспалительных цитокинов в макрофагах, предупреждая чрезмерный воспалительный ответ. Его уровень возрастает в макрофагах, стимулированных IFN/TLR [21].

При введении эндотоксина в различных комбинациях, а также в ответ на тепловой шок индуцируется гЯРНК К (hnRNP K), вовлеченный в регуляцию множества процессов, связанных с экспрессией различных генов. Этот белок служит “стыковочной платформой” для взаимодействия многих сигнальных каскадов [22].

Один из обнаруженных белков, Dpysl2, участвует в реорганизации цитоскелета клеток, регулируя их миграцию [23]. Его синтез зависит от активности клетки.

Енолаза 1 (Eno1) – это мультифункциональный белок, который впервые был охарактеризован как фермент гликолитического пути. Енолаза 1 выполняет регуляторные функции при разных видах стресса [24]. Так при гипоксии и тепловом шоке Eno1 действует как стрессовый белок [14], что показано и в нашей работе, так как мы наблюдали значительную индукцию этого белка в ответ на тепловой шок. Показано также, что ЛПС может активировать киназы семейства MAPK, включая ERK1/2, которые вовлечены в экспрессию мРНК енолазы 1. В ЛПС-стимулированных макрофагах мы наблюдали повышение уровня Eno1, что согласуется с опубликованными данными [24]. Интересно, что в ЛПС-стимулированных моноцитах происходит быстрая транслокация Eno1 к клеточной поверхности, что приводит к локальному накоплению плазматина и, в результате, к миграции клеток к месту воспаления [25].

Таким образом, нами выявлены белки, синтез которых изменялся в ответ на тепловой шок, введение экзогенного БТШ70 или эндотоксина. Эти белки играют, по-видимому, различные, в некоторых случаях противоположные, роли в клетке при

стрессе. По изменению характера синтеза этих белков видно, что предварительное введение экзогенного БТШ70 до обработки макрофагов ЛПС оказывает заметный протективный эффект, что согласуется с результатами опытов *in vivo* [10].

Ясно также, что молекулярные механизмы такой защиты затрагивают различные сигнальные пути, а потому очень сложны и требуют дальнейшего более глубокого изучения.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-00643 и 09-04-00660), а также программы “Динамика генофондов” и программы Президиума Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” (М.Е.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cross A.S., Opal S.M. 2003. A new paradigm for the treatment of sepsis: is it time to consider combination therapy? *Ann. Intern. Med.* **138**, 502–505.
2. Bone R.C. 1995. Sepsis and controlled clinical trials: the odyssey. *Crit. Care Med.* **23**, 1294–1303.
3. Suffrendini A.F., Fromm R.E., Parker M.M., Brenner M., Kovacs J.A., Wesley R.A., Parrillo J.E. 1989. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N. Engl. J. Med.* **321**, 280–287.
4. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zahring U., Seydel U., Di Padova F. 1994. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* **8**, 217–225.
5. Astiz M.E., Rackow E.C. 1998. Septic shock. *Lancet.* **351**, 1501–1505.
6. Шилова В.Ю., Гарбуз Д.Г., Евгеньев М.Б., Зацепина О.Г. 2006. Низкомолекулярные белки теплового шока и адаптация к гипертермии у разных видов *Drosophila*. *Молекуляр. биология.* **40**, 271–276.
7. Asea A., Kraeft S.K., Kurt-Jones E.A., Stevenson M.A., Chen L.B., Finberg R.W., Koo G.C., Calderwood S.K. 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* **6**, 435–442.
8. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. 2009. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции. *Цитология.* **51**, 130–137.
9. Zheng H., Nagaraja G.M., Kaur P., Asea E.E., Asea A.J. 2010. Chaperokine function of recombinant Hsp72 produced in insect cells using a baculovirus expression system is retained. *Biol. Chem.* **285**, 349–356.
10. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatschina O., Garbuz D., Karpov V., Surkov S., Murashev A., Ostrov V., Margulis B., Evgen'ev M., Vinokurov M. 2010. Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1197**, 94–107.
11. Luckow V.A., Lee S.C., Barry G.F., Olins P.O. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**, 4566–4579.

12. O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007–4021.
13. Matrix science, <http://matrixscience.com/>
14. Petrak J., Ivanek R., Toman O., Cmejla R., Cmejlova J., Vyoral D., Zivny J., Vulpe C.D. 2008. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*. **8**, 1744–1749.
15. Samali A., Cai J., Zhivotovsky B., Jones D.P., Orrenius S. 1999. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *EMBO J.* **18**, 2040–2048.
16. Melnick J., Aviel S., Argon Y. 1992. The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. *J. Biol. Chem.* **267**, 21303–21306.
17. Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray P.J.Jr. 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1113**, 28–39.
18. Gesualdi N.M., Chirico G., Pirozzi G., Costantino E., Landriscina M., Esposito F. 2007. Tumor necrosis factor-associated protein 1 (TRAP-1) protects cells from oxidative stress and apoptosis. *Stress*. **10**, 342–350.
19. Munoz L.E., Franz S., Pausch F., Fu B., Sheriff A., Vogt B., Kern P. M., Baum W., Stach C., Laer D., Brachvogel B., Poschl E., Herrmann M., Gaipf U.S. 2007. The influence on the immunomodulatory effects of dying and dead cells of Annexin V. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 6–14.
20. Swearingen K.E., Loomis W.P., Zheng M., Cookson B.T., Dovichi N.J. 2010. Proteomic profiling of lipopolysaccharide-activated macrophages by isotope coded affinity tagging. *J. Proteome Res.* **9**, 2412–2421.
21. Kim J.Y., Ozato K. 2009. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF- κ B activity. *J. Immunol.* **182**, 2131–2140.
22. Bomsztyk K., Denisenko O., Ostrowski J. 2004. hnRNP K: One protein multiple processes. *BioEssays*. **26**, 629–638.
23. Vuillat C., Varrin-Doyer M., Bernard A., Sagardoy I., Cavagna S., Chounlamountri I., Lafon M., Giraudon P. 2008. High CRMP2 expression in peripheral T lymphocytes is associated with recruitment to the brain during virus-induced neuroinflammation. *J. Neuroimmunol.* **193**, 38–51.
24. Saba J.A., McComb M.E., Potts D.L., Costello C.E., Amar S. 2007. Proteomic mapping of stimulus-specific signaling pathways involved in THP-1 cells exposed to *Porphyromonas gingivalis* or its purified components. *J. Proteome Res.* **6**, 2211–2221.
25. Wygrecka M., Marsh L.M., Morty R.E., Henneke I., Guenther A., Lohmeyer J., Markart P., Preissner K.T. 2009. Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. *Blood*. **113**, 5588–5598.