

УДК 577.29

ИНДУКЦИЯ ПУТИ PERK-EIF2 α -ATF4 В М1 МАКРОФАГАХ ПРИ СТРЕССЕ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

© 2024 г. О. Е. Колодеева^{1, *}, Д. А. Аверинская¹, Ю. А. Макарова^{1, 2}, О. Е. Колодеева¹

Представлено академиком РАН В.Г. Дебабовым

Поступило 01.04.2024 г.

После доработки 21.04.2024 г.

Принято к публикации 23.04.2024 г.

Ингибирование трансляции может активировать два пути клеточной гибели. Первый путь опосредован aberrациями трансляции, второй вызван стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭПР). В данной работе исследовано действие рибосом-инактивирующего белка II типа (РИБ-II) вискумина на макрофаги М1, полученные из клеточной линии ТНР-1. Количество модифицированных рибосом оценивали с помощью ПЦР в реальном времени. Анализ транскриптомов показал, что вискумин вызывает индукцию стресса ЭПР, активируемого сенсором PERK.

Ключевые слова: вискумин, М1 макрофаги, ТНР-1, рибосом-инактивирующий белок, PERK-eIF2 α -ATF4 путь, стресс ЭПР

DOI: 10.31857/S2686738924040138

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РИБ-II – рибосом-инактивирующие белки II типа; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; UPR – unfolded protein response; RSR – ribotoxic stress response; ERAD – ER-associated degradation; ОТ-кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ФТ – фактор транскрипции.

Вискумин – это растительный лектин, выделенный из омелы белой (*Viscum album*). Вискумин относится к семейству белков РИБ-II. Еще одним представителем этого семейства является чрезвычайно токсичный белок рицин [1, 2, 3]. Белки РИБ-II – это гетеродимерные гликопротеины, состоящие из двух субъединиц: А (active) и В (binding), связанных дисульфидной связью [4]. А-цепь обладает каталитической активностью и гидролизует N-гликозидную связь аденозина в положении A4324 α -сарцин-рициновой петли 28S рРНК 60S субъединицы эукариотических рибосом [5, 6, 7]. Эта депуринизация приводит к блокировке связывания

фактора элонгации EF-2 с рибосомой, вследствие чего останавливается синтез белка в клетке. Необратимое повреждение рибосом активирует специфический сигнальный путь (ribotoxic stress response, RSR), что в конечном итоге приводит к апоптозу или аутофагии. В-цепь – лектин, который обеспечивает связывание со специфическими клеточными рецепторами [8].

Клиническое применение вискумина (Mistletoe lectin 1) имеет вековую историю [9, 10], однако механизм его терапевтического действия остается неясным. Рассматриваются его противоопухолевые и противовоспалительные эффекты [11, 12]. Семейство РИБ-II насчитывает более десятка белков. Наиболее изученным является рицин. Было показано, что рицин вызывает стресс ЭПР, причем это играет важную роль в реакции клетки на воздействие токсина [13]. Стресс ЭПР возникает в ответ на накопление несвернутых белков в люмене и активирует путь UPR (Unfolded Protein Response). Это изменяет транскрипционные и трансляционные программы клетки, чтобы справиться со стрессовыми условиями [14]. В частности, UPR запускает механизм деградации неправильно свернутых белков в протеасоме (ERAD, ER-associated degradation) и активирует экспрессию шаперонов в ЭПР. В случае, если восстановить жизнеспособность не удастся, UPR индуцирует апоптоз. Существует три основных сигнальных каскада UPR, которые инициируются тремя белковыми сенсорами, локализованными в ЭПР: IRE1 α , PERK и ATF6 [15].

¹НИУ Высшая школа экономики, Факультет биологии и биотехнологии, Москва, Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: oekolodeeva@hse.ru

В физиологических условиях все три сенсора находятся в неактивном состоянии, поскольку связаны с шапероном BiP (HSPA5/GRP78). Этот белок в условиях стресса ЭПР связывается с несвернутыми белками, что приводит к его высвобождению из комплекса с сенсорами и активации сенсоров. Ранее было показано, что обработка клеток ризином активирует только путь, опосредованный IRE1a [13].

В качестве модели изучения стресса ЭПР использовали провоспалительные M1 макрофаги, полученные из клеточной линии THP-1, поскольку макрофаги играют значимую роль в иммунном ответе, являясь основными индукторами воспаления. M1 макрофаги обрабатывали вискумином в диапазоне концентраций от 0.1 до 100 нМ. Цитотоксическое действие вискумина оценивали с помощью метода МТТ. Показано, что 50%-ное ингибирование жизнеспособности (IC50) достигается при концентрации вискумина 4.5 нМ (рис. 1). Небольшое увеличение жизнеспособности клеток при низких концентрациях вискумина может быть связано с тем, что при низких концентрациях он действует как митоген [16]. Чувствительность макрофагов к вискумину оказалась примерно в 1000 раз выше, чем у клеток колоректальной аденокарциномы Сасо-2 [17].

Оценку доли рибосом, инактивированных вискумином, проводили как описано ранее [17]. Вкратце, суть подхода состоит в том, что ревертаза в ходе обратной транскрипции напротив образовавшегося в результате действия токсина AP-сайта встраивает дезоксиаденин. Поэтому синтезированные на интактной и поврежденной матрицах фрагменты кДНК будут отличаться одним нуклеотидом (А вместо Т), что можно детектировать с помощью ПЦР. Обнаружено дозозависимое увеличение количества апуриновых сайтов в 28S рРНК (табл. 1).

Доля модифицированных рибосом в клетках M1 макрофагов после обработки вискумином в концентрации 100 нМ, приводящей к 85% ингибированию жизнеспособности, составила всего 6.45% (рис. 1, табл. 1). Интересно, что, как показано нами ранее, у клеток Сасо-2 при инактивации даже 20% рибосом жизнеспособность не снижается [17]. Эти данные в сочетании с повышенной чувствительностью макрофагов к вискумину позволяют предположить, что цитотоксическое действие вискумина на M1 макрофаги опосредовано не только остановкой трансляции.

С помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) оценили уровни экспрессии генов стресса ЭПР: PERK, IRE1a, DDIT3, ATF4 и ATF6 [18, 19]. При высоких концентрациях вискумина детектировали статистически значимое увеличение экспрессии всех маркерных генов (рис. 2).

Для анализа путей, активируемых во время стресса, провели высокопроизводительное секвенирование на платформе Illumina. Стандартный биоинформатический анализ включал оценку контроля качества,

обрезку адаптеров, картирование на геном человека и оценку дифференциальной экспрессии. Секвенируемые образцы обрабатывали вискумином в концентрации 1 нМ (концентрация, при которой > 50% клеток сохраняют жизнеспособность) в течение 6 ч с последующей инкубацией в среде без вискумина в течение 24 ч. Анализ транскриптома показал, что в результате 742 гена значительно изменили свою экспрессию (FC > 1.5, FDR p-value < 0.05): экспрессия 552 генов была повышена и 190 генов понижена. Значительная часть генов с повышенной экспрессией вовлечена в воспалительные пути, включая NF-κB путь.

Экспрессия генов, активируемых PERK: ATF4 и DDIT3 (рис. 3), увеличилась в 2.6 и 2.2 раза соответственно, что согласуется с результатами ОТ-кПЦР (рис. 2), а экспрессия PERK, ATF6 и IRE1a значимо не изменилась.

Для всех факторов транскрипции (ФТ) проанализировали изменение экспрессии их генов-мишеней с помощью гипергеометрического теста. В табл. 2 представлены ФТ, активирующие наибольшее число

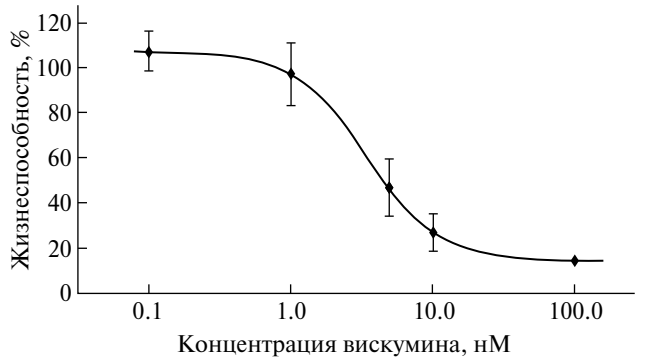


Рис. 1. Кривая жизнеспособности макрофагов M1 при обработке клеток вискумином. Точки на графике представляют среднее значение жизнеспособности по трем биологическим повторам. В качестве планок погрешностей использовали стандартную ошибку среднего. Макрофаги M1, полученные из клеточной линии THP-1, обрабатывали указанными концентрациями вискумина в течение 6 ч с последующей отмывкой и 24-ч инкубацией в культуральной среде.

Таблица 1. Доля апуринизированных молекул в пуле 28S рРНК при обработке макрофагов M1 разными концентрациями вискумина в течение 6 ч и последующей инкубацией в среде без вискумина в течение 24 ч. Эксперимент выполнен в трех биологических повторях.

Концентрация вискумина, нМ	Доля модифицированных 28S рРНК, %
0 (Контроль)	0 ± 0.00
0.1	0.1 ± 0.01
1	1.2 ± 0.3
10	3.8 ± 0.5
100	6.4 ± 0.6

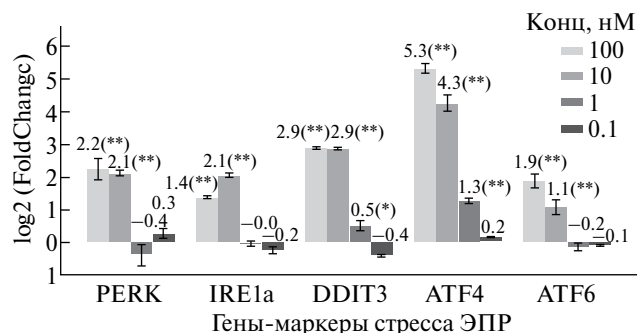


Рис. 2. Оценка индукции стресса ЭПР методом ОТ-кПЦР. Изменение экспрессии $\log_2(FC)$ в обработанных вискумином макрофагах М1 в диапазоне концентраций 0.1 – 100 нМ оценивали относительно контрольных необработанных макрофагов М1 по методу $\Delta\Delta Ct$ [20]. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста Стьюдента с поправкой на множественность методом Бенджамини-Хохберга (** – p -adjusted < 0.005, * – p -adjusted < 0.05). В качестве референсных генов использовали ACTB, GAPDH. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего по трем биологическим повторам. Поляризованные макрофаги М1 обрабатывали указанными концентрациями вискумина в течение 6 ч с последующей инкубацией в среде без вискумина в течение 24 ч.

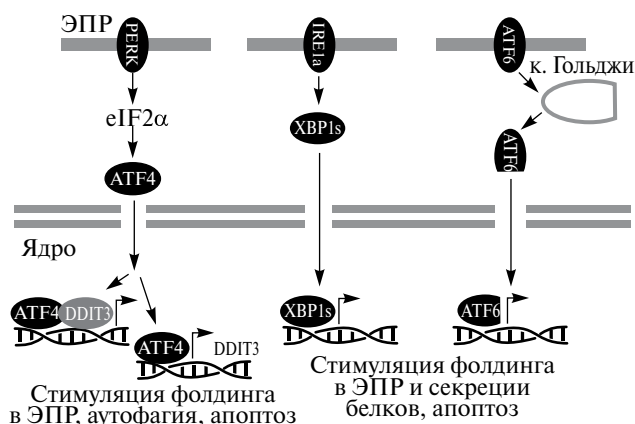


Рис. 3. Схема сигнального пути UPR, индуцируемого стрессом ЭПР. Показаны три каскада UPR, активируемые сенсорами PERK, IRE1a и ATF6.

Таблица 2. ФТ, активирующие наибольшее число мишеней

ФТ	Число мишеней	Отношение шансов	FDR
RELA	158	8.22	0.5e-8
NFKB1	150	8.48	0.5e-8
JUN	64	9.84	0.002
HIF1A	43	9.91	0.005
STAT1	36	10.7	0.004
CEBPB	27	19.1	0.0003
ATF4	21	17.1	0.003

генов-мишеней. Видно, что из трех каскадов UPR активировался только путь PERK-ATF4 (рис. 3, табл. 2).

В число генов-мишеней ATF4 с повышенной экспрессией вошли DDIT3 ($FC = 2.1$, $padj = 4e-11$), участвующий в пути, который активирует сенсор PERK, а также CEBPB ($FC = 1.8$, $padj = 3e-4$), ATF3 ($FC = 2$, $padj = 1.6e-39$), CXCL8 ($FC = 4$, $padj = 6.7e-26$), PPP1P15A/GADD34 ($FC = 3.7$, $padj = 3.2e-125$) и SIRT1 ($FC = 1.6$, $padj = 1.9e-20$), которые активируют воспалительный ответ и апоптоз. Экспрессия ФТ, опосредующих клеточный ответ при активации двух других сенсоров стресса ЭПР – ATF6 и XBP1, а также экспрессия их генов-мишеней значимо не изменилась. Это может свидетельствовать о преимущественном вкладе пути PERK-eIF2α-ATF4 в активацию механизмов ответа макрофагов М1 на обработку вискумином.

Таким образом, М1 макрофаги обладают высокой чувствительностью к вискумину, которая, вероятно, обусловлена не только стрессом, вызванным повреждением рибосом (RSR). Обработка вискумином приводила к активации стресса ЭПР. Из трех ветвей UPR, активируемых сенсорами стресса ЭПР, наиболее значимым оказался путь PERK-eIF2α-ATF4. Это может свидетельствовать о важности сенсора PERK в активации ответа М1 макрофагов на воздействие вискумина. Интересно, что ранее для близкого, но более токсичного белка рибина было показано, что он активирует путь, запускаемый сенсором IRE1a, тогда как путь PERK-eIF2α-ATF4 не активируется [13]. Активация рибинном и вискумином разных путей ответа на стресс ЭПР может вносить вклад в их разную цитотоксичность.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование проводилось в рамках проекта “Создание экспериментальных научно-исследовательских лабораторий по естественно-научным направлениям” и программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Работа выполнена на клеточной линии моноцитов человека THP-1 (приобретена от ATCC), дифференцированной в провоспалительные макрофаги М1. В исследовании отсутствовало изучение человека и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sowa-Rogozńska N. et al.* Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin // *Toxins*. 2019. T. 11. №. 6. C. 350.
2. *Sweeney E.C. et al.* Mistletoe lectin I forms a double trefoil structure // *FEBS letters*. 1998. T. 431– №. 3. C. 367–370.
3. *Moisenovich M. et al.* Endosomal ricin transport: involvement of Rab4-and Rab5-positive compartments / *Histochemistry and cell biology*. 2004. T. 121. C. 429-439.
4. *Agapov I.I. et al.* Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm // *FEBS letters*. 1999. T. 452. №. 3. C. 211-214.
5. *Endo Y., Tsurugi K., Franz H.* The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes The RNA N-glycosidase activity of the protein // *FEBS letters*. 1988. T. 231. № 2. C. 378-380.
6. *Stepanov A.V. et al.* Design of targeted B cell killing agents // *PLoS One*. 2011. T. 6. № 6. C. e20991.
7. *Moisenovich M. et al.* Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells // *European Journal of Cell Biology*. 2002. T. 81. №. 10. C. 529-538.
8. *Lange T. et al.* Importance of altered glycoprotein-bound N-and O-glycans for epithelial-to-mesenchymal transition and adhesion of cancer cells // *Carbohydrate research*. 2014. T. 389. C. 39-45.
9. *Tonevitsky A.G. et al.* Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain // *FEBS letters*. 1996. T. 392. №. 2. C. 166-168.
10. *Bergmann L. et al.* Phase I trial of r viscumin (INN: aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: a study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC protocol number 13001) // *European Journal of Cancer*. 2008. T. 44. №. 12. C. 1657-1662.
11. *Metelmann H.R. et al.* Immunotherapy and immunosurveillance of oral cancers: Perspectives of plasma medicine and mistletoe // *Cancer Immunology: Cancer Immunotherapy for Organ-Specific Tumors*. 2020. C. 355-362.
12. *Schötterl S. et al.* Viscumins functionally modulate cell motility-associated gene expression / *International Journal of Oncology*. 2017. T. 50. №. 2. C. 684-696.
13. *Peterson-Reynolds C., Mantis N.J.* Differential ER stress as a driver of cell fate following ricin toxin exposure // *FASEB BioAdvances*. 2022. T. 4. №. 1. C. 60.
14. *Horrix C. et al.* Plant ribosome-inactivating proteins type II induce the unfolded protein response in human cancer cells // *Cellular and molecular life sciences*. 2011. T. 68. C. 1269-1281.
15. *Boyce M., Yuan J.* Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death // *Cell Death & Differentiation*. 2006. T. 13. №. 3. C. 363-373.
16. *Hoessli D.C., Ahmad I.* Mistletoe lectins: carbohydrate-specific apoptosis inducers and immunomodulators // *Current Organic Chemistry*. 2008. T. 12. № 11. C. 918-925.
17. *Nikulin S.V. et al.* Ribosome inactivation and the integrity of the intestinal epithelial barrier / *Molecular Biology*. 2018. T. 52. №. 4. C. 583-589.
18. *Maltseva D.V. et al.* Biodistribution of viscumin after subcutaneous injection to mice and in vitro modeling of endoplasmic reticulum stress // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017. T. 163. №4. C. 451-456.
19. *Schröder M., Kaufman R.J.* The mammalian unfolded protein response // *Annu. Rev. Biochem.* 2005. T. 74. C. 739-789.
20. *Krainova N.A. et al.* Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells // *Applied biochemistry and microbiology*. 2013. T. 49. C. 743-749.

INDUCTION OF THE PERK-EIF2 α -ATF4 PATHWAY IN M1 MACROPHAGES UNDER ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS

O. E. Kolodeeva^{a, #}, D. A. Averinskaya^a, Yu. A. Makarova^{a, b}, O. E. Kolodeeva^a

^a*Faculty of Biology and Biotechnology, HSE University, Moscow, Russian Federation*

^b*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: oekolodeeva@hse.ru*

Presented by Academician of the RAS V.G. Debabov

Translation inhibition can activate two cell death pathways. The first pathway is activated by translational aberrations, the second by endoplasmic reticulum (ER) stress. In this work, the effect of ribosome-inactivating protein type II (RIP-II) viscumin on M1 macrophages derived from the THP-1 cell line was investigated. The number of modified ribosomes was evaluated by real-time PCR. Transcriptome analysis revealed that viscumin induces the ER stress activated by the PERK sensor.

Keywords: viscumin, M1 macrophages, THP-1, ribosome-inactivating protein, PERK-eIF2 α -ATF4 pathway, ER stress