

УДК 577.214.43

ГИПОКСИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *aroA-1*, *ABCA1* И КОМПОНЕНТА КОМПЛЕМЕНТА С3 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА*

© 2019 А.М. Богомолова^{1,2}, В.С. Шавва², А.А. Никитин^{1,2}, Е.В. Некрасова²,
Э.Б. Дуже², Е.Е. Ларионова², И.В. Кудрявцев², С.В. Орлов^{1,2**}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург,
Россия; электронная почта: s.orlov@spbu.ru, serge@iem.sp.ru

² Институт экспериментальной медицины, 197376 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 10.12.2018

После доработки 29.01.2019

Принята к публикации 29.01.2019

Гипоксия играет важную роль в прогрессии атеросклероза. Локальное снижение концентрации кислорода в бляшке создает специфическое микроокружение, изменяющее транскриптом клеток-резидентов, в частности макрофагов. Одним из путей регрессии атеросклероза является обратный транспорт холестерина из бляшки в печень. Главные участники этого процесса – АТФ-связывающий кассетный транспортер А1 (ABCA1), экспрессирующийся на поверхности всех типов клеток, и аполипопротеин А-1 (ApoA-1), синтез которого происходит главным образом в печени и тонком кишечнике. Недавно была показана экспрессия эндогенного ApoA-1 в макрофагах человека. В то время как функции ABCA1 и ApoA-1 являются атеропротекторными, роль компонента комплемента С3 спорна. Показана положительная корреляция между уровнем С3 в плазме крови и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний у человека. С другой стороны, нокаут по гену С3 в модели атеросклероза на мышах приводит к развитию более крупных бляшек и повышению уровня триглицеридов в крови. В настоящей работе впервые показана активация экспрессии генов *aroA-1* и *С3*, а также повышение содержания внутриклеточного и поверхностного белка ApoA-1 в макрофагах ТНР-1 при ответе на гипоксию, вызванную $CoCl_2$. Выявлен механизм $CoCl_2$ -зависимого повышения уровней мРНК *aroA-1*, *ABCA-1* и *С3* – в активацию генов вовлечены сигнальные каскады MEK1/2–Erk1/2, MKK4/7–JNK1/2/3 и MKK3/6–p38, а также транскрипционный фактор NF-κB, работающий в кооперации с NIF-1α-субъединицей регулятора адаптации к гипоксии NIF-1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: атеросклероз, гипоксия, макрофаги, ТНР-1, ген *aroA-1*, ген *ABCA1*, ген *С3*.

DOI: 10.1134/S0320972519050075

Атеросклероз – хроническое воспалительное заболевание, характеризующееся образованием бляшек в интима артериальных сосудов. Атеросклеротическим изменениям наиболее подвержены искривленные участки артерий, испытывающие так называемый гемодинамический стресс растяжения [1]. Стресс растяжения может быть вызван как ламинарным, так и турбулентным потоком крови, именно второй тип приводит к травмированию сосуда с последующей активацией эндотелия и утолщением *tunica media* и *intima*. Эндотелиоциты начинают

экспрессировать на поверхностной мембране молекулы адгезии, интегрины, селектины и секретировать интерлейкины, интерфероны и другие цитокины. Параллельное увеличение проницаемости стенки сосуда приводит к инфильтрации субэндотелиального пространства липопротеинами низкой плотности (ЛПНП). Эти частицы задерживаются в интима благодаря связыванию с протеогликанами внеклеточного матрикса, где подвергаются различным модификациям (окислению, протеолитическому расщеплению и др.). Модифицированные ЛПНП поглощаются

Принятые сокращения: ApoA-1 – аполипопротеин А-1; ABCA1 – АТФ-связывающий кассетный транспортер А1; ЛПНП и ЛПВП – липопротеины низкой и высокой плотности; мРНК – малая интерферирующая РНК; DMSO – диметилсульфоксид; NIF-1 – фактор 1, индуцирующийся при гипоксии; PBS – фосфатно-солевой буфер; BSA – бычий сывороточный альбумин; PMA – форбол-12-миристинат-13-ацетат; MAPK – митоген-активируемые протеинкиназы; LXR – X-рецептор печени; ОТ-ПЦР в реальном времени – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», BM18-346, 01.04.2019.

** Адресат для корреспонденции.

макрофагами, привлеченными в ходе активации эндотелия, провоцируя накопление внутриклеточного холестерина и, как следствие, трансформацию макрофагов в пенистые клетки [2].

Привлечение новых моноцитов и утолщение интимы за счет пролиферации гладкомышечных клеток ведет к разрастанию атеросклеротической бляшки и увеличению расстояния между капиллярами, питающими среднюю оболочку артерии. Повышенная потребность в кислороде запускает васкуляризацию интимы и бляшки, однако образование новых сосудов сконцентрировано на границах бляшки, в то время как центральная часть находится в условиях постоянной гипоксии [3].

Ключевым медиатором эффектов, опосредуемых гипоксией, является транскрипционный фактор HIF-1. Он функционирует в виде гетеродимера, состоящего из конститутивно экспрессируемой субъединицы HIF-1 β и индуцибельной субъединицы HIF-1 α [4]. В условиях нормоксии белки, обладающие пролилгидроксилазным доменом (PHD1, PHD2, PHD3), и аспарагилгидроксилаза FIH опосредуют протеасомную деградацию HIF-1 α через гидроксилирование. При низких концентрациях кислорода реакция не катализируется, и происходит увеличение времени жизни белка HIF-1 α [5]. HIF-1 способствует пролиферации гладкомышечных клеток и рекрутированию моноцитов, других лейкоцитов и Т-лимфоцитов в бляшку [6, 7], снижает миграционную активность макрофагов и удерживает их в интиме [3]. Таким образом, популяция макрофагов и пенистых клеток постоянно растет.

В настоящее время считается, что центральным путем регрессии атеросклероза является обратный транспорт холестерина в составе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) из макрофагов бляшки в печень. Главные участники этого процесса – аполипопротеин A1 (ApoA-1) и кассетный транспортер ABCA1. ApoA-1 – основной белковый компонент атеропротекторных ЛПВП, определяющий их концентрацию в плазме крови. Основные места синтеза ApoA-1 – печень и тонкий кишечник. ApoA-1 способен усиливать отток холестерина из клеток периферических тканей через ABCA1. ABCA1 – повсеместно экспрессируемый кассетный транспортер, образующий канал в мембране и обеспечивающий «перебрасывание» липидов из клетки энергозависимым путем. В нашей лаборатории был показан синтез эндогенного ApoA-1 в макрофагах человека [8, 9]. Гомогенная по уровню ApoA-1 популяция моноцитов периферической крови человека в ходе дифференцировки разделяется на ApoA-1-бедные и ApoA-1-богатые

макрофаги. Белок обнаруживается в везикулярных компартментах и на поверхности клеточной мембраны, причем в мембране ApoA-1 либо локализуется с ABCA1, либо самостоятельно присутствует в липидных рафтах [8]. Методом проточной цитофлуориметрии было выявлено, что количество мембранного ABCA1 выше в ApoA-1-богатых макрофагах, а трансфекция клеток малой интерферирующей РНК (миРНК) к ApoA-1 приводит к снижению уровня белка ABCA1. Таким образом, синтезируемый макрофагами ApoA-1 играет важную роль в стабилизации ABCA1 в плазматической мембране. Кроме того, оказалось, что ApoA-1 влияет на провоспалительный статус макрофага: нокдаун ApoA-1 с помощью миРНК приводит к усиленной экспрессии IL-1 β и NOS2 в ответ на липополисахарид [8].

Если ApoA-1 и ABCA1 при атеросклерозе обладают протективными свойствами, роль компонента комплемента C3 спорна. Повышенное содержание C3 в плазме крови является фактором риска развития атеросклероза и инфаркта миокарда, а уровень анафилатоксина C3a, продукта гидролиза C3, коррелирует с утолщением интимы и средней оболочки сонной артерии и развитием острого коронарного синдрома [10, 11]. Компоненты системы комплемента обнаруживаются в атеросклеротической бляшке, попадая в интиму из кровотока и синтезируясь клетками-резидентами. Активация каскада в бляшке осуществляется по нескольким путям; к примеру, классический путь может быть запущен аутоантителами к окисленному ЛПНП [12], альтернативный – кристаллами холестерина, что, в конечном итоге, ведет к сборке NLRP3-инфламасомы и продукции провоспалительных цитокинов [13]. Макрофаги бляшки экспрессируют рецепторы к C3a и C5a, с которыми связываются анафилатоксины, что приводит к запуску оксидативного взрыва и синтезу TNF α и IL-1. Также C3a и C5a служат хемоаттрактантами для эозинофилов, тучных клеток, моноцитов, Т- и В-лимфоцитов, увеличивают проницаемость мелких сосудов и вызывают сокращение гладкомышечных клеток [10].

В то же время ряд экспериментов говорит об атеропротекторной роли C3 на системном уровне. Атеросклеротические бляшки мышей, нокаутных по LDL-R и C3, содержат больше пенистых клеток [14], а у таких же мышей с дополнительно нокаутированным ApoE значительно повышается уровень холестерина и триглицеридов в плазме крови, а размер бляшки увеличивается на 84% по сравнению с нокаутными мышами с интактным C3 [15]. Также показана важная роль инактивированного C3b (iC3b) в противовоспалительном клиренсе апоптотических клеток.

Взаимодействие макрофагов и дендритных клеток с iC3b подавляет NF-κB-сигналинг, приводит к уменьшению секреции TGF-β и увеличению продукции IL-10 [16].

Целью данной работы являлось изучение механизмов экспрессии важных для атерогенеза генов *apoA-1*, *ABCA1* и *C3* в макрофагах ТНР-1 человека в условиях гипоксии.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные культуры. Клеточная линия острой моноцитарной лейкемии человека ТНР1 получена из Коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН. Клетки культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С в среде RPMI («Биолот», Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (FCS, «HyClone», США). Дифференцировку моноцитов ТНР-1 в макрофаги индуцировали добавлением в культуральную среду форбол-12-миристит-13-ацетата (PMA) до концентрации 50 нг/мл (81 нМ) на 24 ч. Затем клетки отмывали от PMA, меняли среду на свежую RPMI с 10% FCS и продолжали дифференцировку в течение 48 ч. Таким образом, общее время дифференцировки макрофагов ТНР-1 составляло трое суток.

Антитела. Моноклональные антитела мыши против β-актина человека (ab3280) были приобретены у «Abcam» (Великобритания) и использовались для нормализации образцов по количеству белка в экспериментах по вестерн-блоттингу. Для детекции внутриклеточного белка ApoA-1 применяли поликлональные антитела козы против ApoA-1 человека, описанные ранее [17], и вторичные антитела кролика против IgG козы, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma», США; A5420). Для детекции поверхностного белка ApoA-1 использовали моноклональные антитела мыши против ApoA-1 человека («Bio-Rad», США; 0650-0050) и вторичные антитела кролика F(ab')₂ против IgG мыши, меченные флуорофором Alexa 647 («Abcam», Великобритания; ab169348).

Ингибиторы сигнальных путей. Ингибиторы MAPK и NF-κB приобретены у «Biomol» (США), агонист LXR – у «Sigma» (США). В среду за 1 ч до внесения CoCl₂ добавляли одно из соединений: ингибитор p38 SB203580 (EI-286; 12,5 мкМ), ингибитор JNK1/2/3 SP600125 (EI-305; 10 мкМ), ингибитор MEK1/2 U0126 (EI-282; 10 мкМ), ингибитор NF-κB QNZ (EI-352; 10 нМ), агонист LXR TO901317 (2,5 мкМ). Поскольку все эти вещества были растворены в DMSO, этот агент (в соответствующих концентрациях) использовали в качестве контроля.

Выделение РНК. Клетки высевали на 24-луночные планшеты с плотностью 1×10^4 кл./см² и культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. После 16- или 24-часовой инкубации с CoCl₂ клетки лизировали коммерческим реагентом RNA Extract («Евроген», Россия) и выделяли тотальную РНК в соответствии с рекомендациями производителя. Целостность (отсутствие деградации) выделенной РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле по соотношению полос, соответствующих 28S и 18S рРНК. Концентрацию и чистоту РНК определяли спектрофотометрически при помощи спектрофотометра Avaspec-2048 («Avantes», Нидерланды). Очищенной от примесей РНК соответствовали отношения оптической плотности образцов РНК при 260 и 280 нм, превышавшие значение 2,0, а при 260 и 230 нм – превышавшие значение 1,7.

Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени. В данной работе исследовали экспрессию следующих генов: референсных генов *ACTB* и *GAPDH*, кодирующих β-актин и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу соответственно, и экспериментальных генов *apoA-1*, *ABCA1*, *C3* и *IL-8*. Для проведения реакции обратной транскрипции в качестве затравки использовали обратные праймеры к экспериментальным генам и oligo-dT18, специфические праймеры добавляли по причине малого содержания мРНК экспериментальных генов, а также во избежание синтеза обратной транскриптазой протяженных 3'-нетранслируемых участков. Реакционная смесь (25 мкл) включала в себя 2 мкг РНК, по 0,5 мкл специфических праймеров (2 пмоль/мкл), 0,5 мкл oligo-dT18 (50 пмоль/мкл), обратную транскриптазу M-MLV (50 ед), раствор нуклеотидов (по 0,5 мМ dATP, dGTP, dCTP и dTTP), 5 мкл 5× буфера для обратной транскрипции (250 мМ Tris-HCl, pH 8,3 при 25 °С; 500 мМ KCl; 15 мМ MgCl₂; 50 мМ DTT). Реакцию обратной транскрипции проводили по следующей программе: 42 °С – 1,5 ч, 70 °С – 15 мин, охлаждение до 4 °С. Полученную кДНК хранили при –20 °С и использовали для ПЦР в реальном времени.

Для ПЦР в реальном времени использовали реактивы фирмы «Синтол» (Россия). Праймеры и гибридизационные пробы для генов *ACTB* [18], *GAPDH* [19], *apoA-1* [19], *ABCA1* [20] и *C3* [18] были описаны ранее. Реакционная смесь объемом 25 мкл включала в себя 0,5 мкл праймеров (10 мкМ), 0,2 мкл Taq-полимеразы (1,25 ед), 2,5 мкл 10× ПЦР-буфера (100 мМ Tris-HCl, pH 8,3; 500 мМ KCl; 15 мМ MgCl₂), 1 мкл кДНК (соответствует продуктам реакции обратной транскрипции, полученным с 0,08 мкг тотальной РНК), деионизированную воду (до объема 25 мкл). В конт-

рольные лунки добавляли смесь для ПЦР без кДНК. Реакцию проводили в амплификаторе CFX-96 («Bio-Rad», США). Программа для Taqman: 95 °C – 5 мин; 50 циклов: 95 °C – 25 с, 59,5 °C – 45 с. Программа для SYBR Green: 95 °C – 5 мин; 50 циклов: 95 °C – 30 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 30 с.

Число циклов (значение Ct), необходимое для достижения порогового уровня флуоресценции, превышающего 10 стандартных отклонений от уровня флуктуаций фоновой флуоресценции, определяли при помощи встроенного программного обеспечения «Bio-Rad» (США). Относительное количество кДНК (в процентах от контрольного образца) рассчитывали по формуле: $(2^{Ct \text{ контроля}} - Ct \text{ образца}) \times 100$. Рассчитанные количества кДНК каждого из генов нормировали по геометрическому среднему уровней экспрессии двух референсных генов (*GAPDH*, *ACTB*), как описано ранее [21], и представляли как относительный уровень экспрессии гена, принимая за 100% уровень экспрессии в контрольных клетках.

Вестерн-блоттинг. Клетки трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,6), затем лизировали в буфере RIPA-50 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,01% NaN₃, 1 mM PMSF, pH 7,4). Концентрацию белков в пробах измеряли по методу Лоури. SDS-электрофорез белков проводили в 12%-ном или 20%-ном ПААГ. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в течение 2 ч. В качестве блокирующего буфера использовали 5%-ный раствор обезжиренного сухого молока в PBS с 0,02%-ным Tween 20. Инкубацию в блокирующем буфере проводили в течение 1 ч, инкубацию с первичными антителами – в течение 12 ч при 4 °C, инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, – в течение 1 ч. Визуализацию пероксидазы осуществляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL). Детекцию люминесцентного сигнала производили с помощью системы мультikomплексной визуализации ChemiDoc MP System («Bio-Rad», США).

Проточная цитофлуориметрия. Для детекции AroA-1, связанного с поверхностной мембраной макрофагов, ТНР-1 фиксировали в 4%-ном формальдегиде на PBS в течение 20 мин при 4 °C, трижды отмывали PBS. Далее препараты блокировали в течение 40 мин при 22 °C в блокирующем буфере (1% BSA, 0,02% Tween-20 в PBS). Клетки обрабатывали моноклональными антителами мыши против AroA-1 человека в разведении 1 : 250 в буфере (1% BSA, 0,02% Tween-20 в PBS) при 25 °C в течение 2 ч. После двукратной отмывки блокирующим буфером добавляли

вторичные антитела, конъюгированные с флуорофором Alexa 647, в разведении 1 : 1000 в буфере (1% BSA, 0,02% Tween-20 в PBS), инкубацию проводили в течение 1 ч при 25 °C в защищенном от света месте. В качестве изотипического контроля использовали только вторичные антитела. После отмывки в PBS клетки переносили в пробирки для проточного цитофлуориметра Epics Altra («Beckman Coulter», США) и анализировали с помощью системы Beckman Coulter Navios.

Для выявления цитотоксического действия CoCl₂ ТНР-1 снимали с планшета раствором Версена и без фиксации окрашивали ДНК-связывающими красителями: йодидом пропидия и YO-PRO-1. Йодид пропидия не проникает через интактные клеточные мембраны и окрашивает мертвые клетки, флуоресцируя в красной области спектра. YO-PRO-1 проникает через мембраны апоптотических, но не живых, клеток и флуоресцирует в зеленой области спектра. Анализ проводили с помощью системы Beckman Coulter Navios.

Статистическая обработка. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами выполняли с использованием критерия Стьюдента (непарный *t*-тест). Множественные сравнения проводили с помощью критерия Даннета. Различия считали статистически значимыми при *p* < 0,05. Статистическую обработку данных выполняли в программе Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

CoCl₂ регулирует активность генов *aroA-1* и *C3*, а также повышает содержание белка AroA-1 в макрофагах ТНР-1 в зависимости от концентрации и времени инкубации. Для исследования регуляции экспрессии генов *aroA-1* и *C3* в макрофагах ТНР-1 использовали миметик клеточного ответа на гипоксию CoCl₂. CoCl₂ стабилизирует белок HIF-1α путем ингибирования РНД-содержащих ферментов, опосредующих протеасомную деградацию HIF-1α при нормоксии [5, 22]. Возможные цитотоксические эффекты CoCl₂ выявляли с помощью проточной цитометрии. После инкубации с CoCl₂ клетки окрашивали ДНК-связывающими красителями йодидом пропидия и YO-PRO-1, после чего анализировали спектры флуоресценции. CoCl₂ в диапазоне концентраций 50–300 мкМ провоцирует апоптоз менее чем в 10% клеток по сравнению с контролем. Инкубация клеток с более высокими концентрациями ионов кобальта приводит к

существенному возрастанию гибели клеток (рис. 1, *a*). На рис. 1, *б* приведено распределение клеток по уровням флуоресценции йодида пропидия и YO-PRO-1 после инкубации с 500 мкМ CoCl_2 . В результате только 54% клеток сохраняют жизнеспособность, остальные находятся на тех или иных стадиях апоптоза.

Известно, что гипоксия индуцирует экспрессию генов *IL-8* и *ABCA1* в макрофагах [6, 23, 24]. В данной работе индукцию гена *IL-8* в ответ на гипоксию использовали в качестве положительного контроля. Показано, что уровни мРНК *IL-8* и *ABCA1* максимально возрастают под действием CoCl_2 в концентрации 100 мкМ на сроке инкубации 16 ч (рис. 2). Таким образом, эти условия оптимальны для индукции ответа на гипоксию в макрофагах ТНР-1. CoCl_2 повышает уровень мРНК *apoA-1* во всем диапазоне применяемых концентраций на сроках инкубации 16 и 24 ч (рис. 3, *a*). Увеличивается также количество внутриклеточного (рис. 3, *б*) и поверхностного (рис. 4) белка ApoA-1. Уровень мРНК *C3* возрастает при действии CoCl_2 в концентрации 100 мкМ на сроке инкубации 16 ч, но не 24 ч. При суточной инкубации активность гена снижается, начиная с концентрации 200 мкМ (рис. 3, *в*).

Роль сигнальных каскадов MEK1/2–Erk1/2, MKK4/7–JNK1/2/3 и MKK3/6–p38, а также факторов транскрипции NF-κB и LXR в CoCl_2 -зависимой активации генов *ABCA1*, *C3* и *apoA-1* в макрофагах ТНР-1. Известно, что транспортер

ABCA1, играющий ключевую роль в оттоке холестерина из макрофагов, положительно регулируется Nrf1 на уровне мРНК [24], однако механизм регуляции не изучен. Одним из важнейших участников адаптации макрофагов к гипоксии является транскрипционный фактор NF-κB [25]. В сигналинг, запускаемый в макрофагах при гипоксическом окружении, вовлечены стресс-активируемые MAP-киназы Erk1/2 [26], p38 [27] и JNK [28]. Активация этих киназ в опосредуемых низким содержанием кислорода процессах показана и на других типах клеток [29–32].

Для выявления роли MAP-киназ и фактора транскрипции NF-κB в CoCl_2 -зависимой экспрессии генов *ABCA1*, *C3* и *apoA-1* в макрофагах ТНР-1 использовали ингибиторы киназ p38 (SB203580), JNK1/2/3 (SP600125), MEK1/2 (U0126) и фактора транскрипции NF-κB (QNZ), которые вносили в культуральную среду за 1 ч до добавления CoCl_2 . В качестве положительного контроля использовали агонист LXR (TO901317), приводящий к значительному повышению уровня мРНК *ABCA1* [24] и *apoA-1* [9] в макрофагах.

Показано, что ингибиторы MEK1/2 и JNK1/2/3, но не p38, отменяют CoCl_2 -зависимую активацию экспрессии *ABCA1* (рис. 5, *a*) и *C3* (рис. 5, *б*). Ингибитор NF-κB, помимо отмены действия CoCl_2 , снижает активность обоих генов в клетках, не обработанных CoCl_2 . Агонист LXR, как и ожидалось, сильно повышает уровень мРНК *ABCA1* самостоятельно и совмест-

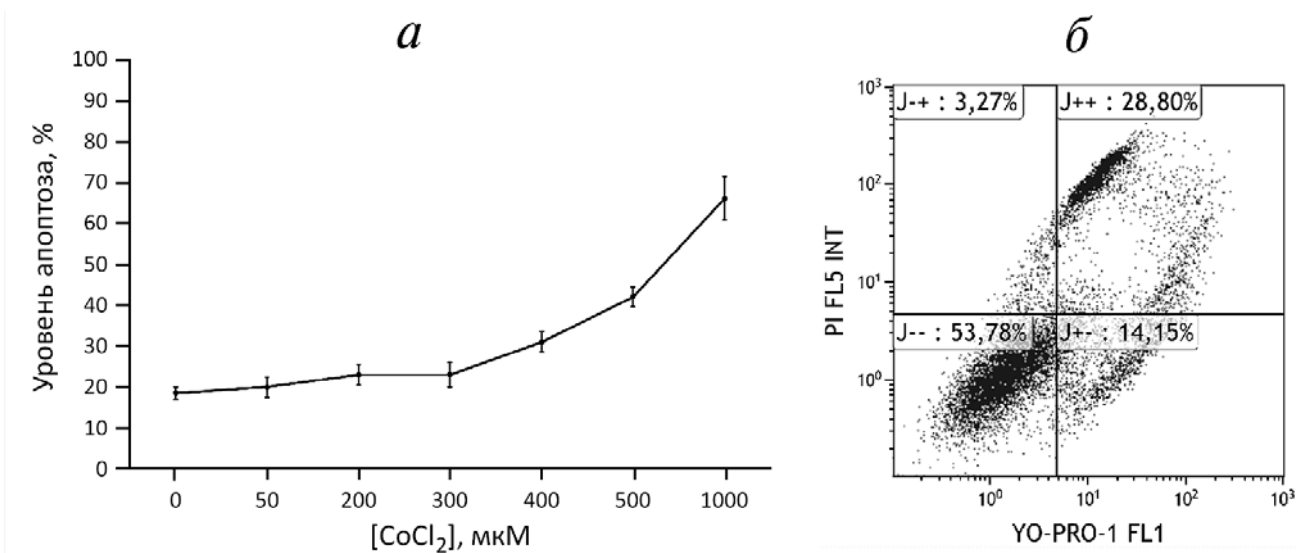


Рис. 1. Выявление цитотоксических эффектов CoCl_2 . *a* – Проточная цитофлуориметрия. Каждая точка на графике представлена как сумма квадрантов J+– и J++ . График построен по данным трех независимых экспериментов. Планка погрешности соответствует стандартной ошибке среднего; *б* – точечный график распределения макрофагов ТНР-1 по уровням флуоресценции YO-PRO-1 и йодида пропидия при обработке 500 мкМ CoCl_2 . Ось YO-PRO-1 FL1 соответствует уровню флуоресценции YO-PRO-1, ось PI FL5 INT – уровню флуоресценции йодида пропидия. Квадранты соответствуют процентному содержанию клеток в разных состояниях: живых клеток (J––), клеток в состоянии раннего (J+–) и позднего (J++) апоптоза, мертвых клеток (обломки клеток; J–+)

но с CoCl_2 . Противоположный эффект агониста наблюдается в отношении гена *C3*, уровень мРНК падает относительно контроля в присутствии и в отсутствии CoCl_2 . Опосредованная ионами Co^{2+} индукция экспрессии гена *apoA-1* зависит от всех трех основных MAP-киназных каскадов (рис. 5, в). При этом блокирование киназ JNK приводит к отмене воздействия гипоксии на уровень активности гена *apoA-1*, тогда как ингибирование киназ p38 и MEK1/2 сопровождается инверсией эффекта ионов Co^{2+} (рис. 5, в). Стимулирующее действие ионов Co^{2+} отменялось также ингибитором NF-κB, но не агонистом факторов транскрипции LXR. Хотя 5'-регуляторная область гена *apoA-1* не содержит сай-

тов связывания для фактора NF-κB, NF-κB-зависимая регуляция гена *apoA-1* в макрофагах была описана ранее [9]. Вероятно, NF-κB регулирует активность гена *apoA-1*, взаимодействуя с лиганд-активированным ядерным рецептором PPARα (негативный регулятор *apoA-1* в макрофагах), что приводит к инактивации обоих факторов транскрипции.

Таким образом, индукция клеточного ответа на гипоксию повышает уровень экспрессии генов *apoA-1*, *ABCA1* и *C3*, а также уровень внутриклеточного и поверхностного белка ApoA-1 в макрофагах ТНР-1. В регуляцию CoCl_2 -зависимой экспрессии генов *ABCA1* и *C3* вовлечены сигнальные каскады NF-κB, MKK4/7–JNK1/2/3 и MEK1/2–Erk1/2, но не MKK3/6–p38. CoCl_2 -зависимая индукция экспрессии гена *apoA-1* зависит от всех трех протестированных MAP-киназных каскадов и фактора транскрипции NF-κB. Активация ядерного рецептора LXRα приводит к возрастанию уровня мРНК *ABCA1* и *apoA-1* в присутствии и в отсутствии CoCl_2 , но оказывает противоположное влияние на экспрессию *C3*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Присутствие локальной гипоксии в атеросклеротической бляшке описано в литературе [33]. Гипоксическое микроокружение является одним из стимулов дифференцировки моноцитов в макрофаги, в частности через активацию провоспалительных генов [34]. Сигналинг, запускаемый в условиях гипоксии, во многом пересекается с воспалительным. Особенно четко это прослеживается на многоуровневом взаимодействии факторов транскрипции NF-κB и HIF-1α, основного модулятора приспособления клетки к гипоксии. NF-κB не только опосредует цитокин-зависимое увеличение уровня транскрипции гена *HIF1A* при гипоксии, но и принимает участие в конститутивной экспрессии фактора [35]. В свою очередь, HIF-1α повышает уровень мРНК p65-субъединицы NF-κB и IKKα [36]. Интересно, что активация NF-κB в условиях гипоксии может частично опосредоваться тем же механизмом, что и стабилизация HIF-1α. Киназа IKKβ, приводящая к диссоциации комплекса NF-κB/IκBα, содержит консервативный мотив LxxLAP для гидроксирования пролина. Такой же мотив в HIF-1α при нормоксии гидроксيليруется PHD-содержащими ферментами. Ингибирование PHD1 и PHD2 приводит к увеличению пула IKKβ в клетке и последующей активации NF-κB [37].

В данной работе мы показали, что ингибирование NF-κB не только инвертирует CoCl_2 -зависимое повышение экспрессии *ABCA1* и *C3*, но

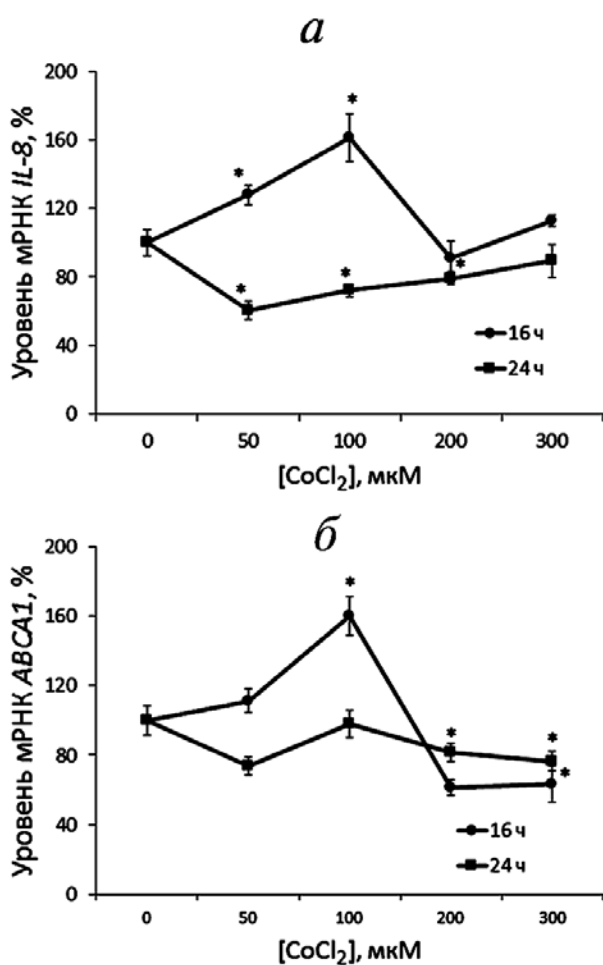


Рис. 2. CoCl_2 регулирует экспрессию генов *IL-8* (а) и *ABCA1* (б) в макрофагах ТНР-1 в зависимости от концентрации и времени инкубации; приведены результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. Клетки инкубировали с CoCl_2 в указанных концентрациях в течение 16 и 24 ч. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Приведены данные по трем независимым экспериментам; * $p < 0,05$ (статистически значимые различия между уровнями мРНК в контрольных и обработанных CoCl_2 клетках, критерий Стьюдента)

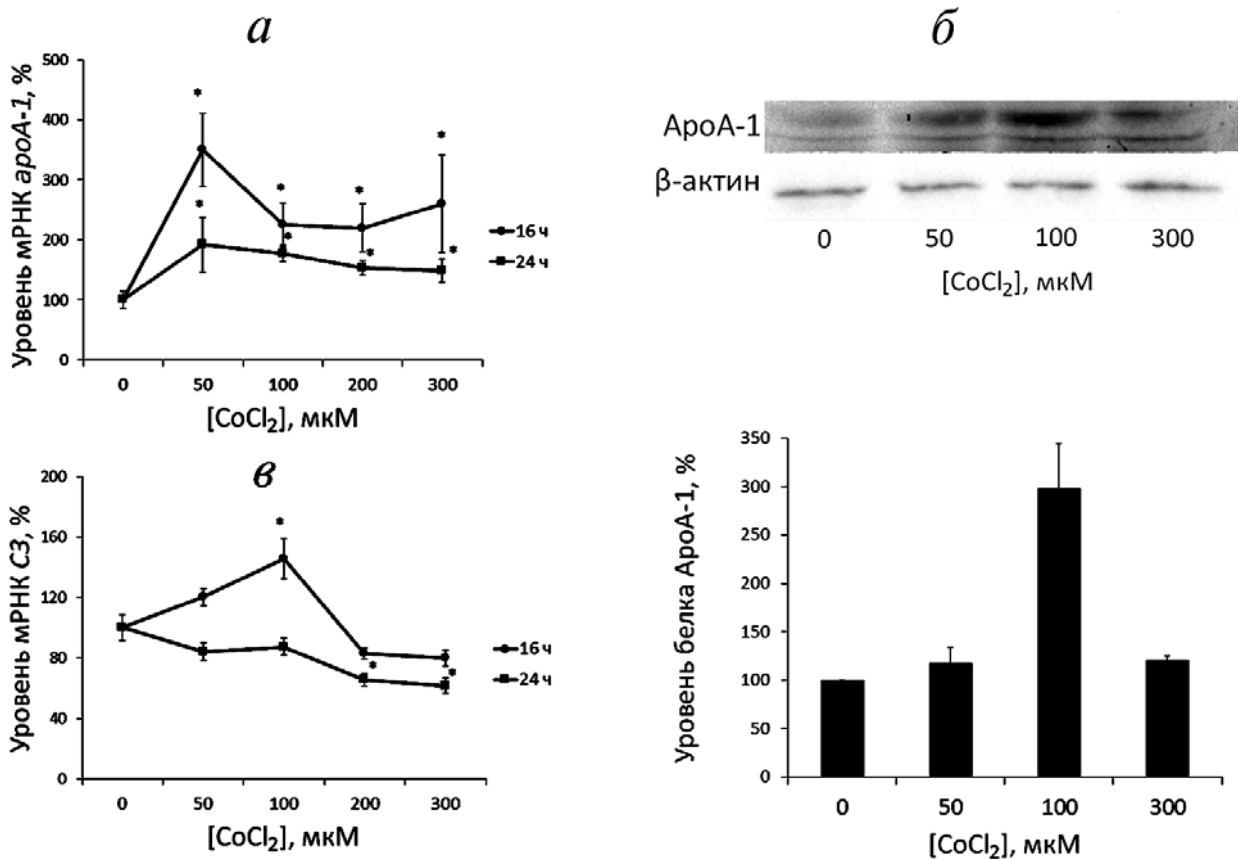


Рис. 3. CoCl₂ регулирует экспрессию генов *ароА-1* (а) и *С3* (б) и увеличивает уровень внутриклеточного белка АроА-1 в макрофагах ТНР-1 в зависимости от концентрации и времени инкубации (в); а, б – результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. Клетки инкубировали с CoCl₂ в указанных концентрациях в течение 16 и 24 ч. Планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего. Приведены данные по трем независимым экспериментам. Значения по оси ординат соответствуют уровню мРНК (%), за 100% принят уровень мРНК в необработанных клетках. * $p < 0,05$ (статистически значимые различия между уровнями мРНК в сравниваемых группах, критерий Стьюдента); в – вестерн-блоттинг. Клетки инкубировали с CoCl₂ в указанных концентрациях в течение 16 ч. На диаграмме представлены данные, полученные в ходе оцифровки трех иммуноблоттов с помощью денситометрии. Значения по оси Y соответствуют относительному уровню белка АроА-1 (%), за 100% принят уровень белка АроА-1 в необработанных клетках. Проведено выравнивание уровня АроА-1 по уровню β-актина

и приводит к снижению уровня мРНК этих генов без индукции ответа на гипоксию. На макрофагах мыши выявлено, что уровень мРНК *ABCA1* повышается при обработке клеток TNFα в NF-κB-зависимой манере [38]. Также показано, что нокдаун NF-κB в клетках эпителия тонкого кишечника предотвращает повышение уровня транскрипции гена *С3* в ответ на IL-1β [39]. Очевидно, что TNFα- и IL-1β-сигналинг можно соотнести с гипоксическим, т.к. в обоих случаях основным модулятором служит NF-κB.

Еще одним важным звеном сигнальных каскадов, активируемых при гипоксии, являются киназы семейства MAP. Мы выявили, что киназы MEK1/2 и JNK1/2/3, но не p38, вовлечены в регуляцию экспрессии генов *ABCA1* и *С3* в макрофагах ТНР-1 при индукции ответа на гипоксию. Существует множество данных, указывающих на кооперацию путей MEK1/2–Erk1/2,

HIF-1 и NF-κB. Известно, что активация HIF-1 требует рекрутирования комплекса p300/CBP. Было показано, что ингибирование MAPK нарушает взаимодействие HIF-1α/p300. Сверхэкспрессия MEK1 приводит к трансактивации обоих белков [40]. Помимо взаимодействия с коактиваторами, транскрипционная активность HIF-1α зависит от ряда посттрансляционных модификаций. Фосфорилирование HIF-1α по остаткам Ser-641/643 киназой Erk1/2 предотвращает его выход из ядра с участием экспортина CRM1, таким образом достигается накопление активного HIF-1α в ядрах клеток [41]. Кроме того, Erk1/2, но не p38, участвует в трансактивации р65-субъединицы NF-κB. Это взаимодействие вовлечено в положительную регуляцию экспрессии гена *MIP-2* в макрофагах мыши при гипоксии [42]. Активация JNK1/2/3 в условиях низкого содержания кислорода показана как в

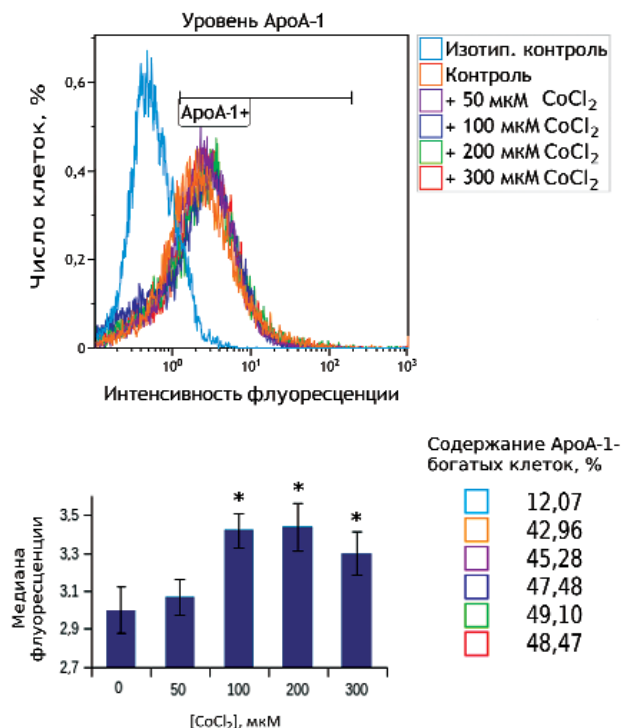


Рис. 4. CoCl₂ увеличивает уровень поверхностного белка AроА-1 в макрофагах ТНР-1: проточная цитофлуориметрия. Графики отражают изменение уровня мембранного AроА-1 при обработке клеток CoCl₂ в указанных концентрациях. AроА-1+ – AроА-1-богатые макрофаги. На диаграмме представлены медианы распределений клеток по уровню поверхностного AроА-1 при различных концентрациях CoCl₂. * $p < 0,01$ (статистически значимые отличия от контроля (нулевая концентрация CoCl₂), критерий Стьюдента). Процент клеток соответствует проценту AроА-1-богатых макрофагов при различных концентрациях CoCl₂ (отмечены соответствующими цветами). С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

макрофагах [28], так и в других типах клеток [30]. Индукция экспрессии гена *aroA-1* в макрофагах в условиях гипоксии зависит также и от активации провоспалительного MAP-киназного каскада p38 помимо каскадов Erk1/2 и JNK1/2/3. Известно, что гипоксия повышает уровень фосфорилированных p38 (активная форма) в нейронах коры гиппокампа [43]. В макрофагах гипоксия усиливает активацию p38 в ответ на пальмитиновую кислоту (вызывает стресс эндоплазматического ретикулума) [44]. Блокирование каскадов p38 и Erk1/2 приводило к усилению базовой экспрессии *aroA-1* и к инверсии стимулирующего воздействия ионов кобальта. В предыдущих работах [45, 46] мы наблюдали усиление базовой экспрессии *aroA-1* при блокировании сигнального каскада Erk1/2 в клетках гепатомы человека HepG2. Установлено, что этот эффект обусловлен фосфорилированием комплекса факторов транскрипции FOXO1/LXR β ,

взаимодействующих с сайтами В и С гепатоцитарного энхансера гена *aroA-1* [45]. Более того, разрушение сайтов В или С в гепатоцитарном энхансере гена *aroA-1* приводило к инверсии воздействия перекиси водорода (оксидативный стресс) на активность 5'-регуляторной области

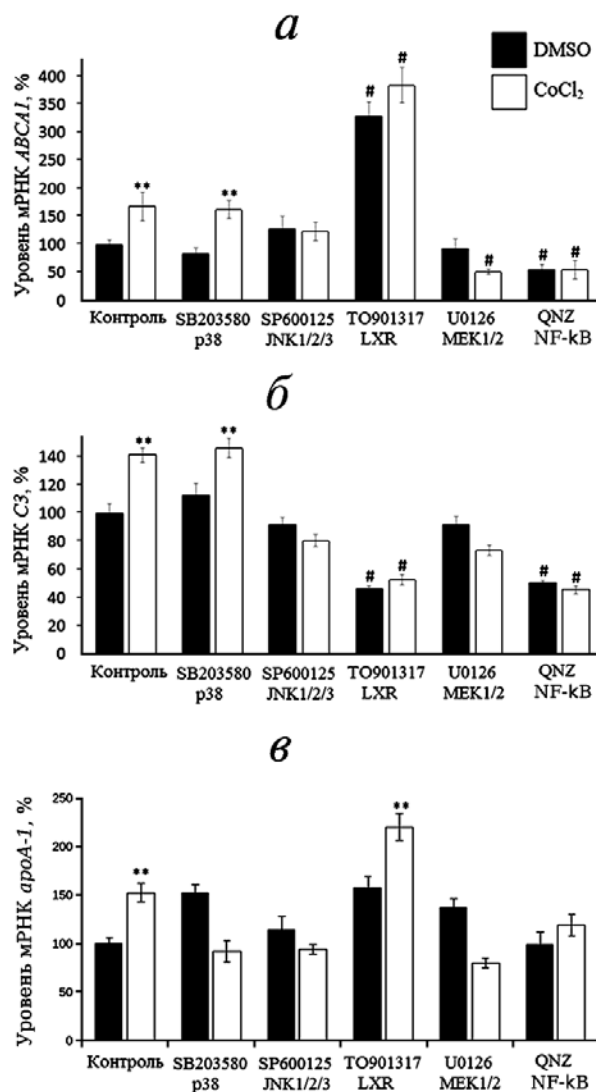


Рис. 5. Роль MAP-киназных каскадов MEK1/2–Erk1/2, MKK4/7–JNK1/2/3 и MKK3/6–p38, а также факторов транскрипции NF- κ B и LXR в CoCl₂-зависимой активации генов *ABCA1* (а), *C3* (б) и *aroA-1* (в) в макрофагах ТНР-1; приведены результаты ОТ-ПЦР в реальном времени. Клетки до внесения в среду 100 мкМ CoCl₂ инкубировали в течение 1 ч с одним из соединений: 12,5 мкМ SB203580, 10 мкМ SP600125, 10 мкМ U0126, 10 нМ QNZ, 2,5 мкМ TO901317. Приведены данные по трем независимым экспериментам. Значения по оси ординат соответствуют уровню мРНК (%), за 100% принят уровень мРНК в клетках, обработанных DMSO. Планка погрешности соответствует стандартной ошибке среднего. ** $p < 0,05$ (статистически значимые различия между уровнями мРНК в сравниваемых группах, критерий Даннета); # $p < 0,05$ (статистически значимые отличия от уровня мРНК в клетках, обработанных DMSO; критерий Стьюдента)

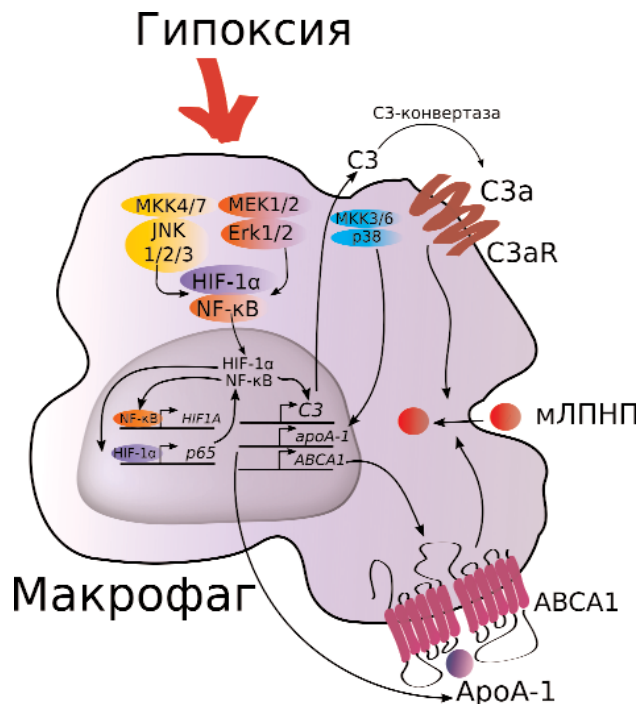


Рис. 6. Гипотетическая схема регуляции генов *ABCA1*, *C3* и *apoA-1* в макрофагах человека в условиях гипоксии (пояснения см. в разделе «Обсуждение результатов»). С цветным вариантом рис. 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: www.elibrary.ru

гена *apoA-1* в клетках HepG2 [46]. Учитывая высокое сходство сигнальных путей, активируемых провоспалительными цитокинами, при гипоксии и в условиях оксидативного стресса [25, 31–37, 44], а также тот факт, что факторы транскрипции FOXO1 и LXR β взаимодействуют с сайтами В и С гепатоцитарного энхансера гена *apoA-1* не только в клетках HepG2, но и в макрофагах человека [9], можно предположить, что обнаруженная в данной работе инверсия воздействия ионов кобальта на активность гена *apoA-1* при блокировании MAP-киназных каскадов p38 и Erk1/2 обусловлена изменением уровня фосфорилирования факторов транскрипции LXR β и FOXO1. Необходимы дальнейшие исследования для прояснения данного вопроса.

В качестве положительного контроля в нашей системе использовался синтетический агонист LXR TO901317, индуцирующий значительное увеличение уровня экспрессии гена *ABCA1*. Как и ожидалось, агонист повысил уровень мРНК *ABCA1* в макрофагах ТНР-1 как самостоятельно, так и совместно с CoCl_2 , что предполагает независимое действие LXR и NF- κ B/HIF-1, описанное в данных Gerbod-Giannone et al. [38]. Интересно обратное действие TO901317 на экспрессию гена *C3*. В наших предыдущих ис-

следованиях показано TO901317-зависимое повышение уровня мРНК *C3* в макрофагах ТНР-1 5-дневной дифференцировки [18]. В настоящей работе срок дифференцировки макрофагов ТНР-1 составил 3 дня. Такой эффект можно сопоставить с механизмом регуляции экспрессии *apoA-1* под действием TNF α , выявленным в нашей лаборатории ранее. В моноцитах ТНР-1 TNF α приводит более чем к пятикратному повышению уровня мРНК *apoA-1*, в то время как в макрофагах ТНР-1 наблюдается повышение уровня мРНК *apoA-1* лишь в 1,5 раза. Показана также и зависящая от времени экспрессия *apoA-1* в моноцитах ТНР-1. Пятикратная индукция экспрессии наблюдается при 24-часовой инкубации с TNF α , 48-часовая инкубация приводит к падению уровня мРНК *apoA-1* до контрольного значения [9].

Обобщая приведенные выше литературные и полученные нами данные, можно рассмотреть механизм положительной регуляции экспрессии генов *apoA-1*, *ABCA1* и *C3* в макрофагах при индукции ответа на гипоксию (рис. 6). Повышенный уровень мРНК и, по-видимому, белка *C3* приводит к увеличению продукции анафилатоксина *C3a*. Связываясь со своим рецептором на поверхности макрофагов, *C3a* индуцирует повышение уровня экспрессии *C3* и усиленный захват модифицированных ЛПНП (мЛПНП) [18]. Хотя эндогенный ApoA-1 стабилизирует *ABCA1* и проявляет противовоспалительные свойства, его содержание не коррелирует с уровнем обратного транспорта холестерина [8]. С другой стороны, известно, что перенос гена *apoA-1* человека в макрофаги мышей, нокаутных по *apoA-1*, с помощью ретровирусных векторов приводит к значительному уменьшению размера бляшек [47]. Кроме того, показано, что нокаут по транспортерам *ABCA1* и *ABCG1* ведет к ухудшению хемотаксиса макрофагов [48]. Принимая во внимание нарушение миграционной активности макрофагов при гипоксии, можно предположить нивелирование этого эффекта эндогенным ApoA-1 через стабилизацию *ABCA1*. Таким образом, если индукцию экспрессии *C3* при гипоксии можно рассматривать как атерогенный фактор, роль повышения уровней мРНК *apoA-1* и *ABCA1* остается спорной и требует дальнейшего изучения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-15-01326; исследования регуляции экспрессии генов *ABCA1* и *C3* в условиях гипоксии; рис. 1 и 2; рис. 3, б; рис. 5, а, б) и Российского фонда фундаментальных исследо-

ваний (грант № 17-04-01947; исследование экспрессии гена *apoA-1*; рис. 3, а, в; рис. 4; рис. 5, в).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Heo, K.-S., Fujiwara, K., and Abe, J. (2014) Shear stress and atherosclerosis, *Mol. Cells*, **37**, 435–440, doi: 10.14348/molcells.2014.0078.
2. Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., and Rezzani, R. (2008) Atherosclerosis and oxidative stress, *Histol. Histopathol.*, **23**, 381–390, doi: 10.14670/HH-23.381.
3. Fong, G.-H. (2015) Potential contributions of intimal and plaque hypoxia to atherosclerosis, *Curr. Atheroscler. Rep.*, **17**, 32–41, doi: 10.1007/s11883-015-0510-0.
4. Parathath, S., Mick, S.L., Feig, J.E., Joaquin, V., Grauer, L., Habel, D.M., Gassmann, M., Gardner, L.B., and Fisher, E.A. (2011) Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism, *Circ. Res.*, **109**, 1141–1152, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.246363.
5. Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A. Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzger, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*, **107**, 43–54, doi: 10.1016/S0092-8674(01)00507-4.
6. Hirani, N., Antonicelli, F., Strieter, R.M., Wiesener, M.S., Ratcliffe, P.J., Haslett, C., and Donnelly, S.C. (2001) The regulation of interleukin-8 by hypoxia in human macrophages – a potential role in the pathogenesis of the acute respiratory distress syndrome (ARDS), *Mol. Med. Camb. Mass*, **7**, 685–697.
7. Murdoch, C., Muthana, M., and Lewis, C.E. (2005) Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation, *J. Immunol.*, **175**, 6257–6263, doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6257.
8. Mogilenko, D.A., Orlov, S.V., Trulioff, A.S., Ivanov, A.V., Nagumanov, V.K., Kudriavtsev, I.V., Shavva, V.S., Tanyanskiy, D.A., and Perevozchikov, A.P. (2012) Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages, *FASEB J.*, **26**, 2019–2030, doi: 10.1096/fj.11-193946.
9. Shavva, V.S., Mogilenko, D.A., Nekrasova, E.V., Trulioff, A.S., Kudriavtsev, I.V., Larionova, E.E., Babina, A.V., Dizhe, E.B., Missyul, B.V., and Orlov, S.V. (2018) Tumor necrosis factor alpha stimulates endogenous apolipoprotein A-I expression and secretion by human monocytes and macrophages: role of MAP-kinases, NF- κ B, and nuclear receptors PPAR α and LXRs, *Mol. Cell. Biochem.*, **448**, 211–223, doi: 10.1007/s11010-018-3327-7.
10. Speidl, W.S., Kastl, S.P., Huber, K., and Wojta, J. (2011) Complement in atherosclerosis: friend or foe? *J. Thromb. Haemost.*, **9**, 428–440, doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04172.x.
11. Hertle, E., van Greevenbroek, M.M., Arts, I.C., van der Kallen, C.J., Geijselaers, S.L., Feskens, E.J., Jansen, E.H., Schalkwijk, C.G., and Stehouwer, C.D. (2014) Distinct associations of complement C3a and its precursor C3 with atherosclerosis and cardiovascular disease. The CODAM study, *Thromb. Haemost.*, **111**, 1102–1111, doi: 10.1160/TH13-10-0831.
12. Binder, C.J., Chang, M.-K., Shaw, P.X., Miller, Y.I., Hartvigsen, K., Dewan, A., and Witztum, J.L. (2002) Innate and acquired immunity in atherogenesis, *Nat. Med.*, **8**, 1218–1226, doi: 10.1038/nm1102-1218.
13. Samstad, E.O., Niyonzima, N., Nymo, S., Aune, M.H., Ryan, L., Bakke, S.S., Lappégard, K.T., Brekke, O.-L., Lambris, J.D., Damas, J.K., Latz, E., Mollnes, T.E., and Espevik, T. (2014) Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release, *J. Immunol.*, **192**, 2837–2845, doi: 10.4049/jimmunol.1302484.
14. Buono, C., Come, C.E., Witztum, J.L., Maguire, G.F., Connelly, P.W., Carroll, M., and Lichtman, A.H. (2002) Influence of C3 deficiency on atherosclerosis, *Circulation*, **105**, 3025–3031.
15. Persson, L., Boren, J., Robertson, A.-K., Wallenius, V., Hansson, G.K., and Pekna, M. (2004) Lack of complement factor C3, but not factor B, increases hyperlipidemia and atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} low-density lipoprotein receptor^{-/-} mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1062–1067, doi: 10.1161/01.ATV.0000127302.24266.40.
16. Amarilyo, G., Verbovetski, I., Atallah, M., Grau, A., Wiser, G., Gil, O., Ben-Neriah, Y., and Mevorach, D. (2010) iC3b-opsinized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF- κ B-dependent blockade, *Eur. J. Immunol.*, **40**, 699–709, doi: 10.1002/eji.200838951.
17. McVicar, J.P., Kunitake, S.T., Hamilton, R.L., and Kane, J.P. (1984) Characteristics of human lipoproteins isolated by selected-affinity immunosorption of apolipoprotein A-I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1356–1360.
18. Mogilenko, D.A., Kudriavtsev, I.V., Trulioff, A.S., Shavva, V.S., Dizhe, E.B., Missyul, B.V., Zhakhov, A.V., Ischenko, A.M., Perevozchikov, A.P., and Orlov, S.V. (2012) Modified low density lipoprotein stimulates complement C3 expression and secretion via liver X receptor and toll-like receptor 4 activation in human macrophages, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5954–5968, doi: 10.1074/jbc.M111.289322.
19. Orlov, S.V., Mogilenko, D.A., Shavva, V.S., Dizhe, E.B., Ignatovich, I.A., and Perevozchikov, A.P. (2010) Effect of TNF α on activities of different promoters of human apolipoprotein A-I gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **398**, 224–230, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.064.
20. Mogilenko, D.A., Shavva, V.S., Dizhe, E.B., Orlov, S.V., and Perevozchikov, A.P. (2010) PPAR γ activates *ABCA1* gene transcription but reduces the level of *ABCA1* protein in HepG2 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 477–482, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.053.
21. Mogilenko, D.A., Kudriavtsev, I.V., Shavva, V.S., Dizhe, E.B., Vilenskaya, E.G., Efremov, A.M., Perevozchikov, A.P., and Orlov, S.V. (2013) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha positively regulates complement C3 expression but inhibits TNF α -mediated activation of *C3* gene in mammalian hepatic derived cells, *J. Biol. Chem.*, **288**, 1726–1738, doi: 10.1074/jbc.M112.437525.
22. Vengellur, A., and LaPres, J.J. (2004) The role of hypoxia inducible factor 1 α in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts, *Toxicol. Sci.*, **82**, 638–646, doi: 10.1093/toxsci/kfh278.

23. Rydberg, E.K., Salomonsson, L., Hulten, L. M., Noren, K., Bondjers, G., Wiklund, O., Bjornheden, T., and Ohlsson, B.G. (2003) Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages, *Atherosclerosis*, **170**, 245–252, doi: 10.1016/S0021-9150(03)00302-2.
24. Schmitz, G., and Langmann, T. (2005) Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1735**, 1–19, doi: 10.1016/j.bbali.2005.04.004.
25. Marsch, E., Sluimer, J.C., and Daemen, M.J. (2013) Hypoxia in atherosclerosis and inflammation, *Curr. Opin. Lipidol.*, **24**, 393–400, doi: 10.1097/MOL.0b013e-32836484a4.
26. Li, R.C., Haribabu, B., Mathis, S.P., Kim, J., and Gozal, D. (2011) Leukotriene B4 receptor-1 mediates intermittent hypoxia-induced atherogenesis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **184**, 124–131, doi: 10.1164/rccm.201012-2039OC.
27. Ortiz-Masia, D., Diez, I., Calatayud, S., Hernandez, C., Cosin-Roger, J., Hinojosa, J., Esplugues, J.V., and Barrachina, M.D. (2012) Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process, *PLoS One*, **7**, e48535, doi: 10.1371/journal.pone.0048535.
28. Fuhrmann, D.C., Tausendschon, M., Wittig, I., Steger, M., Ding, M.G., Schmid, T., Dehne, N., and Brune, B. (2015) Inactivation of tristetraprolin in chronic hypoxia provokes the expression of cathepsin B, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 619–630, doi: 10.1128/MCB.01034-14.
29. Li, Q., Yu, B., and Yang, P. (2015) Hypoxia-induced HMGB1 in wound tissues promotes the osteoblast cell proliferation via activating ERK/JNK signaling, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **8**, 15087–15097.
30. Chiu, C.-Z., Wang, B.-W., and Shyu, K.-G. (2014) Angiotensin II and the JNK pathway mediate urotensin II expression in response to hypoxia in rat cardiomyocytes, *J. Endocrinol.*, **220**, 233–246, doi: 10.1530/JOE-13-0261.
31. Zhang, J., Liu, Q., Fang, Z., Hu, X., Huang, F., Tang, L., and Zhou, S. (2016) Hypoxia induces the proliferation of endothelial progenitor cells via upregulation of Apelin/APLNR/MAPK signaling, *Mol. Med. Rep.*, **13**, 1801–1806, doi: 10.3892/mmr.2015.4691.
32. Wu, Y., Yang, Y., Yang, P., Gu, Y., Zhao, Z., Tan, L., Zhao, L., Tang, T., and Li, Y. (2013) The osteogenic differentiation of PDLSCs is mediated through MEK/ERK and p38 MAPK signalling under hypoxia, *Arch. Oral Biol.*, **58**, 1357–1368, doi: 10.1016/j.archoralbio.2013.03.011.
33. Mayr, M., Sidibe, A., and Zampetaki, A. (2008) The paradox of hypoxic and oxidative stress in atherosclerosis, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **51**, 1266–1267, doi: 10.1016/j.jacc.2008.01.005.
34. Strehl, C., Fangradt, M., Fearon, U., Gaber, T., Buttgerit, F., and Veale, D.J. (2014) Hypoxia: how does the monocyte-macrophage system respond to changes in oxygen availability? *J. Leukoc. Biol.*, **95**, 233–241, doi: 10.1189/jlb.1212627.
35. Taylor, C.T., and Cummins, E.P. (2009) The role of NF- κ B in hypoxia-induced gene expression, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1177**, 178–184, doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05024.x.
36. Walmsley, S.R., Print, C., Farahi, N., Peyssonnaud, C., Johnson, R.S., Cramer, T., Sobolewski, A., Condliffe, A.M., Cowburn, A.S., Johnson, N., and Chilvers, E.R. (2005) Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity, *J. Exp. Med.*, **201**, 105–115, doi: 10.1084/jem.20040624.
37. Cummins, E.P., Berra, E., Comerford, K.M., Ginouves, A., Fitzgerald, K.T., Seeballuck, F., Godson, C., Nielsen, J.E., Moynagh, P., Pouyssegur, J., and Taylor, C.T. (2006) Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF- κ B activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18154–18159, doi: 10.1073/pnas.0602235103.
38. Gerbod-Giannone, M.-C., Li, Y., Holleboom, A., Han, S., Hsu, L.-C., Tabas, I., and Tall, A.R. (2006) TNF α induces ABCA1 through NF- κ B in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3112–3117, doi: 10.1073/pnas.0510345103.
39. Moon, M.R., Parikh, A.A., Pritts, T.A., Fischer, J.E., Cottongim, S., Szabo, C., Salzman, A.L., and Hasselgren, P.O. (1999) Complement component C3 production in IL-1 β -stimulated human intestinal epithelial cells is blocked by NF- κ B inhibitors and by transfection with ser 32/36 mutant I κ B α , *J. Surg. Res.*, **82**, 48–55, doi: 10.1006/jsre.1998.5503.
40. Sang, N., Stiehl, D. P., Bohensky, J., Leshchinsky, I., Srinivas, V., and Caro, J. (2003) MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300, *J. Biol. Chem.*, **278**, 14013–14019, doi: 10.1074/jbc.M209702200.
41. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., and Simos, G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1 α , *J. Biol. Chem.*, **281**, 33095–33106, doi: 10.1074/jbc.M209702200.
42. Zampetaki, A., Mitsialis, S. A., Pfeilschifter, J., and Kourembanas, S. (2004) Hypoxia induces macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) gene expression in murine macrophages via NF- κ B: the prominent role of p42/p44 and PI3 kinase pathways, *FASEB J.*, **18**, 1090–1092, doi: 10.1096/fj.03-0991fje.
43. Haddad, J.J., and Hanbali, L.B. (2014) Hypoxia upregulates MAPK(p38)/MAPK(ERK) phosphorylation *in vitro*: neuroimmunological differential time-dependent expression of MAPKs, *Protein Pept. Lett.*, **21**, 444–451, doi: 10.2174/092986652105140218112521.
44. Snodgrass, R.G., Boss, M., Zezina, E., Weigert, A., Dehne, N., Fleming, I., Brune, B., and Namgaladze, D. (2016) Hypoxia potentiates palmitate-induced pro-inflammatory activation of primary human macrophages, *J. Biol. Chem.*, **291**, 413–424, doi: 10.1074/jbc.M115.686709.
45. Shavva, V.S., Bogomolova, A.M., Nikitin, A.A., Dizhe, E.B., Tanyanskiy, D.A., Efremov, A.M., Oleinikova, G.N., Perevozchikov, A.P., and Orlov, S.V. (2017) Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXR β transcription factors, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 382–396, doi: 10.1002/jcb.25651.
46. Shavva, V.S., Bogomolova, A.M., Nikitin, A.A., Dizhe, E.B., Oleinikova, G.N., Lapikov, I.A., Tanyanskiy, D.A., Perevozchikov, A.P., and Orlov, S.V. (2017) FOXO1 and LXR α downregulate the apolipoprotein A-I gene expression during hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells, *Cell Stress Chaperones*, **22**, 123–134, doi: 10.1007/s12192-016-0749-6.
47. Ishiguro, H., Yoshida, H., Major, A.S., Zhu, T., Babaev, V.R., Linton, M.F., and Fazio, S. (2001) Retrovirus-mediated expression of apolipoprotein A-I in the macrophage protects against atherosclerosis *in vivo*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 36742–36748, doi: 10.1074/jbc.M106027200.
48. Pagler, T.A., Wang, M., Mondal, M., Murphy, A.J., Westerterp, M., Moore, K.J., Maxfield, F.R., and Tall, A.R. (2011) Deletion of ABCA1 and ABCG1 impairs macrophage migration because of increased Rac1 signaling, *Circ. Res.*, **108**, 194–200, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.228619.

HYPOXIA AS A FACTOR INVOLVED IN REGULATION OF EXPRESSION *apoA-1*, *ABCA1* AND COMPLEMENT COMPONENT C3 GENES IN HUMAN MACROPHAGES**A. M. Bogomolova^{1,2}, V. S. Shavva², A. A. Nikitin^{1,2}, E. V. Nekrasova², E. B. Dizhe², E. E. Larionova², I. V. Kudriavtsev², and S. V. Orlov^{1,2*}**

¹ St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia;
E-mail: s.orlov@spbu.ru, serge@iem.sp.ru

² Institute of Experimental Medicine, 197376 St. Petersburg, Russia

Received December 10, 2018

Revised January 29, 2019

Accepted January 29, 2019

Hypoxia plays a crucial role in atherosclerosis progression. Local decrease of oxygen availability in a plaque creates specific microenvironment that alters transcriptome in resident cells, in particular, macrophages. Reverse cholesterol transport from plaque to liver is considered to be one of the ways of atherosclerosis regression. Ubiquitously expressed ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) and liver-derived apolipoprotein A-1 (*ApoA-1*) are two main participants of this process. Recently we have shown endogenous *apoA-1* gene expression in human macrophages. While *ABCA1* and *ApoA-1* possess antiatherogenic properties, the role of a complement factor *C3* is controversial. Plasma *C3* level positively correlates with the risk of cardiovascular diseases in humans. On the other side, *C3* gene knockout in murine atherosclerosis model results in increase both in plaque size and triglycerides content in blood. In the present work we have shown for the first time that hypoxia-mimicking agent, CoCl_2 , caused the upregulation of *apoA-1* and *C3* genes along with the increase in *ApoA-1* intracellular and membrane content in THP-1 macrophages. MEK1/2–Erk1/2 and MKK4/7–JNK1/2/3 cascades are involved in *ABCA1* and *C3* gene upregulation via activation of NF- κ B transcription factor, which synergies with HIF-1 α subunit of HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1). All three main MAP-kinase cascades (Erk1/2, JNK1/2/3, and p38) as well as NF- κ B transcription factor are involved in the hypoxia-induced expression of *apoA-1* gene in THP-1 macrophages.

Keywords: atherosclerosis, hypoxia, macrophages, THP-1, *apoA-1* gene, *ABCA1* gene, *C3* gene