УДК 577.29:576.5

УРОВЕНЬ мРНК ТРАНСПОРТЕРОВ ЦИНКА ЗАВИСИТ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ЦИНКА И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ HIV-1 Tat В ЛИНИЯХ КЛЕТОК МЫШЦ (RD) И МОНОЦИТАХ (THP-1)*

© 2021 К. Аллури¹, С.Р. Ятхапу², Н.Б. Кондапалли³, Р. Хемалатха³, К.М. Наир⁴**, С. Гош¹**

¹ Molecular Biology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; электронная почта: bihongo@yahoo.com ² Drug Toxicology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India ³ Microbiology and Immunology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India ⁴ Micronutrient Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; электронная почта: nairthayil@gmail.com

Поступила в редакцию 01.06.2020 После доработки 27.08.2020 Принята к публикации 15.09.2020

При недостатке цинка в моноцитах и мышечных клетках наблюдается функционально различное поведение с точки зрения системы депонирования цинка (в мышцах, в отличие от моноцитов, уровень цинка сохраняется на обычном уровне). Целью настоящей работы было изучение влияния уровня цинка и HIV-1 Tatопосредованного воспаления на экспрессию транспортеров цинка в этих типах клеток. Уровень экспрессии транспортеров цинка (ZnTs, ZIPs и металлотионеина MT) в клетках RD и THP-1 определяли с помощью метода qRT-PCR как по отдельности, так и при совместном культивировании этих клеток. Уровни экспрессии белка ZnT1 определяли с использованием метода вестерн-блоттинга. Значительное повышение уровня мPHK белков MT и ZnT1 при добавлении цинка и снижение при дефиците цинка указывает на важную роль генов, кодирующих транспортеры цинка, в поддержании гомеостаза цинка в этих тканях. В клетках RD ZIP10 продемонстрировал обратную корреляцию с уровнем цинка, в то время как в клетках THP-1 никакой корреляции обнаружено не было. Tat-индуцированное воспаление приводило к значительному повышению уровня транскриптов MT, IL-6, ZIP7, ZIP8 и ZIP9 в клетках RD при сокультивировании, в то время как в клетках THP-1 наблюдалось повышение уровня IL-1β и снижение уровня ZIP7 и ZIP14. Уровень цинка и HIV-1 Tat-индуцированное воспаление, по-видимому, оказывают влияние на дифференциальную экспрессию MT, ZnTs и ZIPs в мышечных клетках и в моноцитах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транспортеры цинка, ZIP, ZnT, MT, совместное культивирование, HIV-1 Tat, THP-1, RD.

DOI: 10.31857/S0320972521020056

введение

При недостатке цинка его уровень в скелетной мышце, коже и сердце не изменяется, однако снижается в кости, моноцитах, печени, яичках и плазме крови [1, 2]. Содержание цинка в лимфоцитах, гранулоцитах и тромбоцитах при его дефиците в течение 8–12 недель также снижается [3]. Концентрация ионов цинка не изменяется при краткосрочном незначительном дефиците цинка (12–16 мкМ), однако при продолжающемся дефиците Zn происходит снижение его концентрации в плазме крови [4]. Гомеостаз цинка поддерживается в результате коорди-

** Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: BCR – рецептор В-клеток; DMEM – модифицированная Дульбекко среда Игла; DMSO – диметилсульфоксид; FBS – фетальная бычья сыворотка; HIV – вирус иммунодефицита человека; IKK – IкВ-киназа; IL – интерлейкин; MHC – основной комплекс гистосовместимости; МТ – металлотионеин; МТF – металлотранскрипционный фактор; Nef – негативный фактор экспрессии; PKB/AKT – протеинкиназа B; RD – клетки рабдомиосаркомы; SLC – семейство транспортеров растворенных веществ; Tat – трансактиватор транскрипции; TNF – фактор некроза опухолей а; TPEN – N,N,N',N'-тетракис-(2-пиридилметил) этилендиамин; ZIP – Zrt- и Irt-подобный белок; ZnT – транспортер цинка.

^{*} Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/ biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-125, 02.11.2020.

нированной регуляции активности транспортеров цинка, которые принадлежат к двум основным семействам: белки ZnTs (транспортеры цинка) и белки ZIPs (Zrt- и Irt-подобные белки) вместе с белком МТ (металлотионеин), который представляет собой внутриклеточный цинксвязывающий белок. Белки ZnTs (ZnT1–ZnT10) кодируются семейством генов *SLC30* (solute carrier) и участвуют в высвобождении внутриклеточного Zn; в то время как белки-транспортеры ZIPs (ZIP1–ZIP14), кодируемые семейством генов *SLC39*, ведут к повышению внутриклеточной концентрации цинка.

Кроме того, экспрессия белков ZIPs изменяется с возрастом, а также регулируется посттранскрипционно. Было показано, что уровень цинка *per se* сильнее влияет на экспрессию ZIP1, ZIP2 и ZIP3 в лимфоцитах молодых людей по сравнению с пожилыми [5]. Токсичность цинка предотвращается эндоцитозом транспортера ZIP4 из плазматической мембраны или его убиквитин-опосредованной деградацией [6]. Когда цинк находится в доступности, происходит усиление трансляции ZIP5, опосредованное взаимодействием консервативной шпильки и двух перекрывающихся сайтов связывания микроPHK в 3'-нетранслируемом регионе [7].

Цинк играет незаменимую роль в развитии, созревании и функционировании NK-клеток (natural killers) и NKT-клеток (natural killer T cells) [8]. Известно, что активация тучных клеток при аллергическом ответе замедленного типа происходит при участии белка ZnT5 [9]. Было показано, что у мышей при сепсисе/бактериальной инфекции повышается экспрессия ZIP8 в ответ на активацию NF-кВ. ZIP8-опосредованный приток цинка вызывает ингибирование активности ІКК (ІкВ-киназы) и тем самым подавляет воспаление [10]. Аналогично известно, что ZIP9 способствует повышению уровня внутриклеточного цинка, приводя к активации протеинкиназы В (РКВ/АКТ), фосфорилированию киназы, регулируемой внеклеточными сигналами ERK (extracellular signal-regulated kinase), и активации рецептора В-клеток (BCR) [11]. В различных работах показано, что повышенные концентрации Zn вызывают ингибирование транскрипции вируса иммунодефицита человека (HIV-1) наряду с формированием новых инфекционных вирионов. В то же время применение Zn совместно с Зидовудином (Zidovudine, ZDV/AZT) приводит к снижению заболеваемости, вызванной оппортунистическими инфекциями, и диареи у ВИЧ-инфицированных детей [12–15]. Хорошо известно, что ВИЧ является цинк-зависимым ретровирусом, в котором Zn стимулирует вирусный фермент интегразу, таким образом облегчая встраивание вирусной ДНК в ДНК клетки-хозяина [16, 17]. Более того, химиотерапевтическая эффективность некоторых ароматических С-нитрозосоединений основана на их способности удалять цинк из мотивов цинкового пальца нуклеокапсида HIV-1, таким образом предотвращая инфицирование вирусом [18].

Было показано, что такие белки HIV-1, как гликопротеин 120 (gp120), негативный фактор экспрессии (Nef), трансактиватор транскрипции (Tat) и регулятор экспрессии белков вириона (Rev), могут вызывать атрофию мышц, катаракту, нефропатию, поражения кожи и иммунодефицитные состояния [19, 20]. Таt-индуцированная запрограммированная гибель клеток приводит к снижению числа лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных [21]. Напротив, Tat обладает также и митогенной активностью в клетках эпителия молочной железы и амниона и способствует передаче вируса от матери к ребенку [22]. Интересно, что цинк является необходимым для активности белка Tat, чье действие обязательно для репликации HIV [23]. Известно, что Tat стимулирует секрецию жидкости от серозной к люминальной стороне энтероцитов, в то время как цинк предотвращает такую активность [24].

Tat обладает ингибирующим действием в отношении основного комплекса гистосовместимости (MHC – major histocompatibility complex) I-го и II-го класса и индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов, таким образом модулируя иммунный ответ на инфицирование HIV-1 [25, 26]. Кроме того, значительное количество данных подтверждает, что развитию кахексии, или болезни похудания (slim disease), у больных ВИЧ/СПИД способствует ограниченный МНС-І полиомиозит, опосредованный цитотоксическим действием Т-клеток [27, 28]. Состояние кахексии в дальнейшем усугубляется действием провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1β и фактор некроза опухолей TNF- α , которые секретируются ВИЧ-инфицированными моноцитами/макрофагами [29]. Возникновение атрофии скелетных мышц у больных ВИЧ/СПИД может быть вызвано изменениями циркулирующих уровней цитокинов и миостатина в крови больных [30, 31].

С учетом данных, представленных выше, целью настоящей работы было изучение влияния уровня цинка и воспаления в клетках, из которых цинк высвобождается (моноциты), и клетках, в которых депонируется (мышечные клетки). Мы предположили, что за различный ответ этих клеток на дефицит цинка и развитие воспаления ответственны транспортеры цинка. Поэтому мы провели эксперименты на тканеспецифичных репрезентативных линиях клеток, а именно THP-1 (моноциты) и клетки рабдомиосаркомы (RD) мышцы человека. Был изучен ответ этих клеток на добавление экзогенного цинка, его дефицит, опосредованный действием TPEN – хелатора внутриклеточного цинка (N,N,N',N'-тетракис-(2-пиридилметил) этилендиамин), а также воспаление, индуцированное HIV-1 Tat.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Реагенты для культивирования клеток, среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), среда RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), FBS (фетальная бычья сыворотка), глутамакс, смесь антибиотиков и противогрибковых агентов, поли-L-лизин, этиловый эфир Zinquin (zinquin ethyl ester), DMSO (диметилсульфоксид) и TPEN были заказаны в компании «Sigma-Aldrich» (США). Набор пептидов ВИЧ (HIV-1 Consensus B Tat Peptide Pool; Cat:12706) был любезно предоставлен по программе Национального Института Здоровья по борьбе с ВИЧ (США).

Источники клеточных линий. Линия лейкемических моноцитов человека ТНР-1 была любезно предоставлена институтом CSIR-IICT (Индия). Линия клеток RD была приобретена в ATCC (American type culture collection, CIIIA). Клетки выдерживали при 37 °С в увлаженной атмосфере с 5% СО₂, и культуральную среду сменяли один раз в два дня. Клетки THP-1 и RD культивировали в среде RPMI-1640 и DMEM соответственно с добавлением 10% FBS и по 1% глутамакса и смеси антибиотиков и противогрибковых средств. Клетки выдерживали в логарифмической фазе роста, эксперименты проводили после достижения состояния ~70-80%-ной конфлюэнтности. Культуральная среда, за исключением FBS, не содержала цинк.

Обработка цинком и ТРЕN клеток ТНР-1 и RD. Для удаления избыточного цинка из среды клетки промывали фосфатным солевым раствором PBS. Клетки ТНР-1 и RD обрабатывали 25 мкМ цинка в форме сульфата цинка в комплексе с 25 мкМ бычьего сывороточного альбумина BSA («Sigma», США) [32] или 5 мкМ TPEN (хелатор внутриклеточного цинка) для создания дефицита цинка, оцениваемого по жизнеспособности клеток (окрашивание трипановым синим) в течение 4 ч в бессывороточной среде. Затем клетки ТНР-1 фиксировали на покровных стеклах, покрытых 0,1 мг/мл поли-L-лизина. Все эксперименты выполнялись трижды как независимые повторения. Поглощение этилового эфира Zinquin в культурах клеток RD и THP-1. Как было описано в предыдущем разделе, клетки инкубировали с 25 мкМ цинка в виде сульфата цинка или 5 мкМ TPEN в течение 4 ч в бессывороточной среде. Клетки промывали PBS и затем инкубировали с 10 мкМ цинк-специфичного флуоресцентного зонда этилового эфира Zinquin в течение 30 мин [33]. Флуоресцентный комплекс Zn–Zinquin визуализировали, считывая флуоресцентную эмиссию на 490 нм при возбуждении на 370 нм с использованием флуоресцентного микроскопа с фильтром GFP (EVOS FLC «Life Technologies», США).

Определение внутриклеточного цинка. Суспензию клеток (5 × 10⁶/мл) THP-1 и трипсинизированных клеток RD инкубировали с 10 мкМ этилового эфира Zinquin при 37 °C в течение 30 мин [34]. Клетки трижды промывали PBS и ресуспендировали в PBS. Флуоресценцию проб объемом 2 мл (5 × 10⁶ клеток/мл) в кюветах регистрировали при длине волны 490 нм при возбуждении на 370 нм с помощью спектрофлуориметра Jasco FP-6500 («Jasco», Япония).

Вестерн-блоттинг для определения уровня транспортера ZnT1. Клетки лизировали в буфере для анализа радиоиммунопреципитации RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз. Концентрацию белка в супернатанте определяли с помощью набора Micro BCA («Thermo Fisher Scientific», США). Белки (50 мкг) разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия SDS (10% SDS-PAGE), разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны («Bio-Rad», США). После блокировки мембран 5%-ным раствором сухого молока, мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °C с антителами против ZnT1. Затем их промывали и инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами класса IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Иммуноблоты проявляли с помощью набора ECL detection kit («Bio-Rad», США) и получали изображения с помощью системы визуализации G-box («Syngene», США). В качестве контролей количества белка при анализе клеток ТНР-1 и RD использовали β-актин и ГАФДГ (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) соответственно.

Совместное культивирование клеток RD и THP-1 для определения роли HIV-1 Tat. Для определения роли Tat-индуцированного воспаления на межклеточные взаимодействия было проведено совместное культивирование клеток RD и THP-1. Вкратце, клетки RD были посажены с плотностью 0,9 × 10⁶/мл, через 24 ч среду

меняли на свежую DMEM. Моноциты сажали на монослой клеток RD в соотношении 1 : 1, добавляли Tat (100 нг/мл) и инкубировали в течение 8 ч [35]. Суспензию клеток THP-1 помещали на клетки RD аналогичным образом и использовали в качестве контроля для сокультивируемых клеток. После инкубации суспендированные клетки THP-1 были аспирированы и отмыты с помощью PBS. Прикрепленные клетки RD также тщательно промывались PBS для удаления суспендированных клеток THP-1. Эти снятые клетки были использованы для определения уровня экспрессии MT, ZnTs, ZIPs, IL-6 и IL-1β с использованием метода количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью pearenta Trizol («Life Technologies», США), следуя инструкциям производителя. Для синтеза кДНК с помощью набора Verso cDNA synthesis kit («Thermo Fisher Scientific», CША) использовали 1 микрограмм РНК. gRT-PCR проводили с использованием красителя 2× SYBR Green («Takara Bio», Япония) и ген-специфичных праймеров (табл. S1 в Приложении) на термоциклере С1000 с оптическим модулем СFX96 («Bio-Rad», США). Все протоколы проводились дважды. Продукты амплификации ПЦР также анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом для подтверждения чистоты амплифицированного продукта ПЦР. Для нормализации результатов, полученных на клетках RD и ТНР-1, использовали ГАФДГ и β-актин соответственно. Продукты ПЦР всех образцов также анализировали путем определения кривой плавления для подтверждения чистоты продукта амплификации. В качестве отрицательного контроля использовали соответствующий образец мРНК без обратной транскриптазы. Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали по методу 2-аст.

Окрашивание внутриклеточных цитокинов для определения TNF-α. Экспрессию цитокина TNF-α в ответ на введение пула пептидов Tat исследовали в иммунных клетках, т.е. только в клетках ТНР-1. Вкратце, совместно культивируемые клетки ТНР-1 обрабатывали Tat (100 нг/мл), затем добавляли ингибитор транспорта белков GolgiStop[™] («BD Biosciences», США) и инкубировали не более 12 ч. Реакцию останавливали центрифугированием клеток и промыванием жидкостью Sheath fluid (BD FACS Flow, «BD Biosciences», США). Затем клетки ресуспендировали в 250 мкл раствора цитофикс/цитоперм в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Клетки промывали

с антителами PE-Cy7 TNF-α («BD Biosciences», США) при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин для определения уровня мембраносвязанного TNF-α. Несвязавшиеся антитела дважды отмывали буфером Perm/Wash («BD Biosciences», США) и ресуспендировали в 400 мкл промывочного буфера. Полученные с использованием проточного цитометра (BD FACS Aria-II, «BD Biosciences», США) данные анализировали с помощью программы Flow Jo 10.7 («Flow Jo», США).

дважды промывочным буфером и инкубировали

МНС-І при воспалении. Совместно культивируемые клетки RD и THP-1 окрашивали препаратом anti-HLA-ABC-FITC («Miltenyi Biotec», Германия) или препаратом для изотопного контроля REA Control FITC («Miltenyi Biotec», Германия) в течение 30 мин при 4 °С в соответствии с инструкциями производителя. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, как было описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гомеостаз цинка поддерживается путем регуляции экспрессии тканеспецифичных транспортеров цинка. Тем не менее, насколько нам известно, пока не было проведено детальных исследований экспрессии генов в функционально различных тканях. В настоящей работе мы определяли уровень внутриклеточного цинка с помощью флуоресцентной микроскопии и спектрофлуориметрии. Профили экспрессии MTs, ZnTs и ZIPs анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Уровни внутриклеточного Zn в условиях избытка или недостатка цинка. Клетки ТНР-1 (рис. 1, a-e) и RD (рис. 1, e-e), культивируемые с цинком и TPEN в течение 4 ч, демонстрировали флуоресценцию этилового эфира Zinquin в сравнении с соответствующими контролями, что указывает на то, что интернализация Zinquin может быть использована для количественного определения цинка в этих клетках. Соответственно, средний уровень цинка в обеих линиях клеток был значительно (p < 0,05) повышен при добавлении цинка (7,92 ± 0,10 нМ в клетках THP-1 и $13,5 \pm 0,44$ нМ в клетках RD) в сравнении с контролем (1,97 ± 0,103 нМ в клетках THР-1 и 5,78 \pm 0,3 нМ в клетках RD). В то же время было обнаружено существенное (p < 0.05) снижение уровня цинка в этих клетках после обработки TPEN (0,94 \pm 0,06 нМ в клетках THP-1 и $3,98 \pm 0,45$ нМ в клетках RD) в сравнении с контролем (табл. S2 в Приложении). Таким об-



Рис. 1. Определение содержания внутриклеточного цинка в клетках RD и THP-1. Клетки обрабатывали 25 мкМ цинка или 5 мкМ TPEN в течение 4 ч. Затем клетки промывали PBS для удаления красителя вне клеток и получали изображения при λ_{ex} 359 нм/ λ_{em} 485 нм, фиксируя синюю флуоресценцию комплекса цинка и этилового эфира Zinquin. Клетки THP-1: *a* – использованные в качестве контроля не обработанные красителем; *б* – обработанные 25 мкМ цинка; *в* – обработанные 5 мкМ TPEN. Аналогично клетки RD: *г* – использованные в качестве контроля не обработанные течение 30 мин. (С цветными вариантами рис. 1, 5 и 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http:// sciencejournal.ru/journal/biokhsm/)

разом, обе линии клеток THP-1 и RD реагируют на уровень цинка, и эти результаты подтверждают данные, полученные нами ранее на клетках кости [36].

Экспрессия МТ, hZnTs и hZIPs в ответ на добавление цинка. Уровни экспрессии MT, hZnTs и hZIPs (h – human, белки клеток человека) в клетках THP-1 измеряли с помощью qRT-PCR при добавлении 25 мкМ цинка (ZnSO₄). Значительное (p < 0.05) повышение (в 22 раза) уровня мРНК металлотионеина (МТ) в клетках ТНР-1 свидетельствует о сильном ответе на добавление цинка (рис. 2, *a*; табл. S3 в Приложении). Аналогично наблюдалось значительное (p < 0.05) повышение (в 2,9 раза) уровня экспрессии мРНК ZnT1 в клетках THP-1 (рис. 2, *a*). Более того, данное наблюдение было подтверждено повышенной экспрессией белка ZnT1 (рис. 3, *a*). Экспрессия ZIP9 в клетках THP-1 также значительно (p < 0,05) повышалась (в 1,3 раза) по сравнению с контролем при их обработке экзогенным цинком (рис. 2, δ).

Аналогично значительное (p < 0,05) повышение экспрессии металлотионеина (в 25 раз) и ZnT1 (в 5,6 раза) в клетках RD указывает на их положительный ответ на избыток цинка в среде (рис. 2, *в*). Более того, методом вестерн-блоттинга было подтверждено повышение уровня белка ZnT1 в этих клетках (рис. 3, *б*). При исследовании различных белков ZIPs было обнаружено значительное снижение (в 0,3 раза) уровня экспрессии белка ZIP10 в сравнении с необработанным контролем (рис. 2, *г*).

Добавление цинка не оказало заметного влияния на экспрессию других белков ZnTs (ZnT4–ZnT7 и ZnT9) и ZIPs (ZIP1, ZIP3, ZIP6–ZIP9, ZIP13 и ZIP14). В клетках THP-1 и RD экспрессии белков ZnT2, ZnT3, ZnT8,

ZnT10, ZIP2, ZIP4, ZIP5 и ZIP12 выявлено не было.

Насколько нам известно, к настоящему моменту не опубликовано работ о кинетике экспрессии большинства транспортеров цинка в мышцах человека (преобладающий резервуар Zn) в ответ на флуктуации уровня цинка и условия воспаления. Экспрессия металлотионеина МТ, цинк-запасающего белка, зависит от уровня цинка и может оказывать влияние на множество внутриклеточных процессов [37, 38]. В клетках THP-1 и RD было выявлено значительное повышение уровня МТ (в 22–25 раз в клетках THP-1 и RD) в ответ на добавление цинка. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными *in vitro* исследований касательно ответа THP-1 на избыток цинка [39].

Металлозависимый фактор транскрипции МТF играет важную роль в активации транскрипции МТ и ZnT1 в ответ на металлы [40, 41]. Поэтому, как и ожидалось, в клетках THP-1 и RD при достаточности цинка значительно повышались уровни МТ и ZnT1, что подтверждало полученные ранее данные in vitro (клетки THP-1) и in vivo (тонкий кишечник, печень и почки) [42-44]. Несмотря на функционально противоположные роли в поддержании гомеостаза цинка в презентируемых тканях (THP-1 – моноциты и клетки RD – мышцы), их общий способ регуляции через МТЕ-1-опосредованную активацию в присутствии или отсутствии цинка [40, 41] предполагает наличие общего способа оценки уровня цинка в организме в целом. Поэтому мы предположили, что ZnT1 является одним из основных транспортеров цинка, регулирующих содержание цинка в мышечных клетках и в моноцитах, что согласуется с его повсеместной экспрессией в качестве эффлюксного транспортера в плазматической мембране различных типов клеток [45]. Отсутствие реакции некоторых из белков ZnTs и ZIPs на добавление Zn может быть связано с их ролью в гомеостазе Zn. Например, ZnT4 и ZnT6 переносят Zn из внутриклеточных компартмен-



Рис. 2. Экспрессия генов транспортеров цинка в клетках THP-1 и RD. Тотальная PHK была выделена и затем синтезирована кДНК. Определение относительного количества мРНК проводили методом qPCR с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. мРНК нормализовали относительно мРНК β -актина и ГАФДГ. Клетки THP-1: *a* – уровни мРНК MT, hZnTs; δ – уровни мРНК hZIPs. Клетки RD: *в* – уровни мРНК MT, hZnTs; ϵ – уровни мРНК hZIPs. Клетки RD: *в* – уровни мРНК MT, hZnTs; ϵ – уровни мРНК hZIPs. Клетки были обработаны 25 мкМ цинка в течение 4 ч. Столбцы представляют среднее значение ± SE трех повторов (*n* = 3) трех независимых экспериментов. Верхние индексы означают значимые различия при *p* < 0,05. Достоверность различий между обработанными и контрольными клетками анализировали с помощью метода ANOVA и последующего множественного сравнения по критерию Даннета (Dunnett's *t*-test)

Zinc Control Zinc TPEN Control TPEN ZnT1-ZnT1-GAPDH **B-Actin**

Рис. 3. Вестерн-блоттинг для определения общего уровня транспортеров ZnT1 в клетках THP-1 и RD после добавления или удаления цинка на 4 ч. а – Клетки THP-1; б – клетки RD; обрабатывали цинком или TPEN (хелатор цинка). Control – контроль, Zinc – добавление 25 мкМ цинка, TPEN – удаление цинка путем внутриклеточного хелатирования. ГАФДГ использовалась в качестве внутреннего контроля в случае клеток RD, а β-актин –для клеток THP-1 для нормализации содержания белка

тов на периферию при достаточно высокой концентрации Zn [46]. Также был показан более выраженный ответ ZIP4 на недостаток Zn в сравнении с его достаточным уровнем [46].

Кроме того, результаты настоящей работы согласуются с результатами Overbeck et al., которые наблюдали низкий уровень экспрессии белка ZnT4 и отсутствие экспрессии ZnT2, ZnT3 и ZnT8 в клетках THP-1, культивированных с сульфатом цинка [43]. В то время как никаких значительных изменений уровня мРНК ZnT5 в клетках THP-1 в присутствии цинка отмечено не было, все же было зарегистрировано снижение уровня белка [43]. Известно, что MTF-1 играет двойственную роль, активирующую или ингибирующую, в зависимости от уровня Zn. Он снижает экспрессию ZIP10 в условиях достаточности Zn и повышает её при дефиците Zn [47]. Тем не менее при добавлении цинка к клеткам экспрессия ZIP10 в клетках THP-1 существенно не изменялась, в то время как в клетках RD было зафиксировано ее снижение, что подтверждает данные работы Ryu et al. (2008) [48]. Подавление экспрессии ZIP10 в условиях достаточности Zn может быть связано с механизмом регуляции, включающим связывание MTF-1 с металл-респонсивными элементами (MRE), в ходе которого MTF-1 приостанавливает транскрипцию Pol II [46].

Влияние дефицита цинка на экспрессию МТ, ZnTs и ZIPs в клетках THP-1 и RD. Элиминация внутриклеточного цинка с помощью TPEN приводила к значительному снижению экспрессии MT (в 0,55 раза), ZnT1 (в 0,13 раз), ZnT5 (в 0,58 раз) и ZnT6 (в 0,44 раза) в клетках THP-1 в сравнении с контролем (рис. 4, *a*). Уровень синтеза мРНК коррелировал с уровнем белка ZnT1, определяемым методом вестерн-блоттинга (рис. 3, а). Данные по снижению экспрессии МТ, ZnT1, ZnT5 и ZnT6 подтверждают ранее полученные результаты на клетках ТНР-1 в условиях дефицита цинка [39, 49]. В то же время было по-

казано значительное повышение экспрессии ZIP9 (в 1,81 раз), ZIP10 (в 4,7 раза) и ZIP14 (~4,9 раз) и снижение экспрессии ZIP13 (в 0,3 раза) в клетках ТНР-1 в условиях дефицита цинка (рис. 4, δ). В то же время недостаток Zn не оказывал заметного влияния на экспрессию ZnT4, ZnT7, ZnT9, а также ZIP1, ZIP3, ZIP6, ZIP7 и ZIP8. С другой стороны, в условиях дефицита цинка в клетках THP-1 экспрессия ZnT2, ZnT3, ZnT8, ZnT10, ZIP2, ZIP4, ZIP5 и ZIP12 не детектировалась. В случае ZIP2, полученные нами результаты противоречат ранее полученным данным о важной роли этого белка в Zn-дефицитных клетках THP-1, что может быть связано с методологическими различиями в инкубации с 5 мкМ TPEN в течение 18 ч или же с 16 мкМ TPEN в течение 4 ч для создания условий внутриклеточной недостаточности цинка [35, 39].

Аналогично в ответ на дефицит цинка клетки RD отвечали значительным снижением экспрессии MT (в 0,5 раза) и ZnT1 (в 0,3 раза) (рис. 4, в), что было подтверждено уровнем экспрессии белков (рис. 3, б). Однако в этих условиях экспрессия ZnT5, ZnT7, ZIP6, ZIP8, ZIP10, ZIP13 и ZIP14 значительно повышалась в 1,9; 1,5; 1,5; 1,4; 2,5; 1,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, e, z). В отличие от клеток THP-1, в условиях дефицита цинка в клетках RD повышалась экспрессия ZnT5. Тем не менее дефицит Zn не оказывал заметного влияния на паттерны экспрессии других белков ZnTs (ZnT4, ZnT6, ZnT9) и ZIPs (ZIP1, ZIP3, ZIP7). Также наблюдалось некоторое повышение экспрессии ZIP9, но оно не было статистически достоверным. Экспрессия восьми транспортеров цинка не детектировалась (ZnT2, ZnT3, ZnT8, ZnT10 и ZIP2, ZIP4, ZIP5, ZIP12). Таким образом, в клетках THP-1 и RD в условиях дефицита Zn транспортеры ZIPs экспрессируются в различной степени.

Было показано, что двойственная роль MTF-1 является причиной снижения экспрес-





сии ZIP10 при избытке цинка и повышения его экспрессии в условиях дефицита цинка [47]. Наши данные по ZIP10 в клетках THP-1 и RD согласуются с этими наблюдениями: экспрессия ZIP10 в клетках THP-1 и RD в условиях дефицита цинка повышалась в 4,7 и 2,5 раза соответственно [46, 47]. Среди разнообразных эффлюксных и инфлюксных транспортеров цинка МТ, ZnT1 и ZIP10, вероятно, регулируются сходными механизмами в условиях избытка и недостатка цинка в моноцитах и мышечных клетках. При этом мы наблюдали противоположные паттерны экспрессии ZIP13 и ZIP14 в клетках THP-1 и RD в условиях дефицита цинка. С помощью нокаута генов Zip13 и Zip14 у мышей было показано, что эти транспортеры Zn регулируют Zn-опосредованные сигнальные пути, и поэтому аномальная их экспрессия вызывала нарушения роста и гомеостаза костей [46]. Эти данные способствуют понимаю роли MTF-1 в регуляции MT, ZnT1 и ZIPs (ZIP10, ZIP13 и ZIP14) в ответ на изменения уровня Zn в клетках THP-1 и RD.

Влияние Таt-индуцированного воспаления на МНС-I и внутриклеточный ТNF- α . С помощью метода флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) в совместно культивированных клетках ТНР-1 и RD оценивался эффект Таt (100 нг/мл) на МНС-I. Было обнаружено, что уровни экспрессии МНС-I в присутствии Таt остаются без изменений в обоих типах клеток по сравнению с соответствующими контролями (рис. 5). В то же время в клетках ТНР-1 значительно повышался уровень внутриклеточного TNF- α (~3,6 раза) в присутствии Tat (100 нг/мл) в сравнении с необработанными контрольными клетками (рис. 6).

Для понимания эффекта воспаления на транспортеры цинка мы провели совместное культивирование клеток THP-1 и мышечных клеток RD для стимулирования перекрестных связей между репрезентативными тканями и обработали их пептидами HIV-1 Таt в течение 8 ч. В предыдущих работах по изучению воспалительного ответа клеток THP-1 на обработку бел-



Рис. 4. Экспрессия генов транспортеров цинка в ответ на обработку ТРЕN в клетках THP-1 и RD. Выделяли препарат тотальной PHK и синтезировали кДHK. Определение относительного количества мРНК проводили методом qPCR с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. мРНК нормализовали относительно мРНК β -актина и ГАФДГ. Уровни экспрессии мРНК в клетках, обработанных 5 мкМ TPEN: *a* – уровни мРНК МТ и hZnTs в клетках THP-1; δ – уровни мРНК hZIPs в клетках THP-1; *в* – уровни мРНК МТ и hZnTs в клетках RD. Столбцы представляют среднее значение ± SE трех повторов (*n* = 3) трех независимых экспериментов. Верхние индексы означают значимые различия при *p* < 0,05. Достоверность различий между обработанными и контрольными клетками анализировали с помощью метода ANOVA и последующего множественного сравнения по критерию Даннета (Dunnett's *t*-test)

a	б
Sample Name	Sample Name
RD isotype control	THP-1 Isotype control
RD cells co-culture control with THP-1	THP-1 cells co-culture control with RD
RD cells co-cultured with THP-1 treated with Tat (100ng/mL)	THP-1 cells co-cultured with RD treated with Tat (100ng/mL)
200 -	200 -



Рис. 5. Экспрессия MHC-I в обработанных Tat клетках RD и THP-1. Совместно культивируемые мышечные клетки RD (*a*) и моноциты THP-1 (*b*) были обработаны набором пептидов HIV-1 Tat в течение 8 ч, и экспрессия MHC-I оценивалась с помощью проточной цитометрии. Данные показаны на гистограмме: клетки, культивированные в обычной среде (контрольная гистограмма) с наложенной гистограммой для экспериментальных клеток, обработанных Tat (показаны различными цветами)



Рис. 6. Экспрессия TNF- α в обработанных Tat клетках THP-1. Совместно культивируемые клетки THP-1 обрабатывали набором пептидов Tat в концентрации 100 нг/мл в течение 8 ч. Экспрессию TNF- α определяли с помощью проточной цитометрии с окрашиванием внутриклеточного цитокина TNF- α . Данные показаны на гистограмме: контрольная гистограмма показана синим цветом; клетки, обработанные Tat, показаны красным цветом. Сдвиг означает повышение экспрессии TNF- α . Клетки, культивированные в обычной среде (контрольная гистограмма синего цвета) с наложенной гистограммой для экспериментальных клеток, обработанных Tat (показана красной линией)

ком Tat (100 нМ в течение 12 ч) было показано повышение уровня TNF- α [50]. Наши данные также демонстрируют значительное повышения уровня внутриклеточного TNF- α в совместно культивированных клетках THP-1, подвергшихся воздействию белка Tat.

Влияние Tat на экспрессию транспортеров цинка в совместно культивированных клетках ТНР-1. В клетках ТНР-1, культивированных совместно с клетками RD, был зарегистрирован воспалительный ответ на Tat в виде повышенного в 1,4 раза уровня IL-1 β (рис. 7, *a*). В то же время различий в уровне IL-6 в сокультивируемых THP-1 по сравнению контрольными сокультивируемыми клетками не было. В работах по изучению влияния белка Tat на макрофаги при обработке им в течение 4 ч было показано повышение уровней IL-6 и IL-1β [51]. В настоящей работе была продемонстрирована значительная экспрессия IL-1β в клетках THP-1, обработанных Tat; однако для IL-6 такого эффекта обнаружено не было. Таt-индуцированное воспаление приводило к значительному (p < 0.05) снижению (в 0,5 раза) уровня транспортеров цинка ZIP7 и ZIP14 в совместно культивированных клетках ТНР-1 по сравнению с необработанными контрольными клетками (рис. 7, б). Эти результаты согласуются с ответом дендритных клеток (DCs)

мыши на обработку липополисахаридом (LPS), при которой происходит снижение экспрессии ZIP6 и ZIP10, в то время как экспрессия ZnT1, ZnT4 и ZnT6 повышается, вызывая снижение содержания цинка в цитозоле [52]. В сокультивированных с RD клетках THP-1 после обработки белком Tat наблюдалось повышение уровня ZIP9, однако оно не было статистически достоверным. При этом значительных изменений уровней MT, ZnT1, ZnT4–ZnT7, ZnT9, ZIP1, ZIP3, ZIP6, ZIP8, ZIP10 и ZIP-13 в сокультивированных с RD клетках THP-1, обработанных белком Tat, не наблюдалось.

Аналогично влияние Tat на экспрессию белков ZIPs (инфлюксные транспортеры цинка) предполагает значительное снижение экспрессии ZIP7 и ZIP14 в совместно культивированных клетках THP-1. Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями действия воспаления на клетки эпителия легких [53]. Напротив же, инфекция и воспаление вызывают повышение экспрессии ZIP14 посредством IL-6/IL-1β, приводящее к возникновению гипоцинкемии в результате транспортировки цинка в печень [54, 55]. Согласно литературным данным, стимуляция воспаления посредством LPS в дендритных клетках приводит к снижению экспрессии ZIP6 и повышению MHC-II [56]. Таким образом, полученные нами данные об отсутствии изменений уровня MHC-I могут быть обусловлены неизменным уровнем ZIP6 при воздействии Tat. Кроме того, очевидно, что дендритные клетки с повышенной экспрессией ZIP6 не способны активировать антиген-специфичные клетки CD4⁺ Th [52].

Известно, что ZIP14 локализуется на плазматической мембране и импортирует цинк в цитоплазму из внеклеточной среды. В настоящей работе было показано, что экспрессия ZIP14 в ответ на белок HIV-1 Таt снижается. Мы предполагаем, что снижение экспрессии ZIP14 может способствовать сохранению уровня сывороточного цинка, что может благоприятствовать инфицированию ВИЧ. С другой стороны, недостаточное количество цинка в клетках THP-1 приводит к запуску апоптоза [57, 58].



Рис. 7. Экспрессия генов в сокультивируемых клетках THP-1 и RD. После выделения PHK определяли относительное количество мPHK с использованием ПЦР в реальном времени с окрашиванием SYBR Green. Уровни мPHK нормализовали относительно мPHK β -актина и ГАФДГ. Уровни экспрессии мPHK в клетках, обработанных Tat (100 нг/мл) в течение 8 ч: *a* – уровни экспрессии белков hZnTs в клетках THP-1; δ – белков hZIPs в клетках THP-1; *в* – белков hZnTs в клетках RD; *г* – белков hZIPs в клетках RD. Столбцы представляют среднее значение ± SE (*n* = 3). Верхние индексы обозначают статистически достоверные различия при *p* < 0,05 с использованием парного независимого критерия

Влияние Tat на экспрессию транспортеров цинка в совместно культивированных клетках **RD.** В совместно культивированных с THP-1 клетках RD наблюдается значительное (p < 0.05) повышение уровня IL-6 (в 2 раза) в сравнении с необработанными контрольными клетками, что предположительно свидетельствует о провоспалительном ответе на Tat (рис. 7, β). В то же время уровни IL-1 β в совместно культивированных клетках RD, обработанных и не обработанных пептидами Tat, относительно одинаковы. Ответ металлотионеина (MT) на обработку Таt заключался в значительном повышении (в 2,3 раза) его содержания в совместно культивированных клетках RD по сравнению с контрольными необработанными клетками. Ранее было показано, что Tat-индуцированные воспалительные ответы являются тканеспецифичными, и дифференциальная экспрессия была подтверждена паттерном экспрессии IL-6: в мононуклеарных клетках периферической крови PBMCs – минимальный ответ, в ТНР-1 – слабый и в астроцитах - сильный ответ на воздействие пептидов Tat [59].

Аналогично значительно повышался уровень транспортеров цинка ZnT5 (в 1,6 раза), ZIP7 (в 1,7 раза), ZIP8 (в 2,6 раза) и ZIP9 (в 1,6 раза) в совместно культивированных клетках RD в ответ на обработку Tat (рис. 7, e). В то же время заметных изменений уровня других белков ZnTs (ZnT1, ZnT4, ZnT6, ZnT7, ZnT9) и ZIPs (ZIP1, ZIP3, ZIP6, ZIP10, ZIP13, ZIP14) в обработанных Tat клетках RD после их сокультивирования с клетками THP-1 зарегистрировано не было (рис. 7, e и e).

Влияние белка Tat на экспрессию белков ZIPs, инфлюксных транспортеров цинка, свилетельствует 0 значительном снижении экспрессии ZIP7 и ZIP14 в совместно культивированных клетках ТНР-1, в то время как в клетках RD было зафиксировано повышение экспрессии ZIP7, ZIP8 и ŽIP9. Возможно, мышечные клетки дают сигнал моноцитам снижать экспрессию белков ZIPs, чтобы они могли запасти больше цинка. Однако настоящая работа ограничена отсутствием данных по транскрипционной регуляции MTF-1 и маркеров апоптоза, и потому мы не можем проверить наше предположение.

Похоже, что два функционально противоположных типа клеток, RD (мышцы) и THP-1 (моноциты), поддерживают гомеостаз внутриклеточного цинка путем скоординированной регуляции МТ и транспортеров цинка и совместного действия для модуляции транзиторных изменений уровня цинка. Продемонстрировано, что ZIP10 подвергается дифференциальному регулированию в мышцах, так как его уровень снижался при избытке цинка, но оставался неизменным в клетках ТНР-1 в тех же условиях. HIV-1 Таt-опосредованное воспаление вызывало снижение экспрессии некоторых транспортеров цинка, например, ZIP7 и ZIP14, особенно в клетках THP-1, сокультивируемых с клетками RD, в то время как в мышечных клетках RD уровни белков ZIPs были повышены. Это может указывать на перенаправление цинка в мышцы и работать таким образом в качестве пассивного резервуара цинка. Снижение количества моноцитов у больных ВИЧ/СПИД, вероятно, опосредованно снижением уровня внутриклеточного цинка, что приводит к запуску апоптоза в моноцитах. Несмотря на то что результаты настоящей работы основаны на модели клеточных линий, это может помочь нам понять природу различных ответов клеток на уровень цинка и воспаление.

Финансирование. Выполнение данной работы проходило при поддержке грантов, предоставленных К. П. М. Наиру, и гранта, выделенного С. Гошу (5/9/1137/2014-NUT) Индийским советом по медицинским исследованиям (Indian Council of Medical Research), Индия. Авторы выражают благодарность д-ру Б. Динешу Кумару, научному сотруднику G & Head-DTRC, за совместное использование оборудования и реагентов из проекта ICMR-Taskforce № HIV/ 62/47/2016-ECD-II.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность CSIR – New Delhi (Индия) за финансовую поддержку, оказанную Кирану Аллури для JRF и SRF (09/484/(0050)/2012-EMR-1).

Соблюдение этических норм. В данной статье не содержатся результаты работ с участием людей или лабораторных животных, выполненных кем-либо из авторов статьи.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/ journal/10541), том 86, вып. 2, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Itsumura, N. (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism, *Physiol. Rev.*, 95, 749-784.
- 2. Jackson, M. (1989) Physiology of Zinc: General Aspects, Zinc in Human Biology, pp. 1-14.
- Beck, F. W., Kaplan, J., Fine, N., Handschu, W., and Prasad, A. S. (1997) Decreased expression of CD73 (ecto-5'nucleotidase) in the CD⁸⁺ subset is associated with zinc deficiency in human patients, *J. Lab. Clin. Med.*, **130**, 147-156.
- 4. Prasad, A. S. (2008) Zinc in human health: effect of zinc on immune cells, *Mol. Med.*, **14**, 353-357.
- Giacconi, R., Malavolta, M., Costarelli, L., Busco, F., Galeazzi, R., et al. (2012) Comparison of intracellular zinc signals in nonadherent lymphocytes from young-adult and elderly donors: role of zinc transporters (Zip family) and proinflammatory cytokines, *J. Nutr. Biochem.*, 23, 1256-1263.
- Mao, X., Kim, B. E., Wang, F., Eide, D. J., and Petris, M. J. (2007) A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, 282, 6992-7000.
- Weaver, B. P., and Andrews, G. K. (2012) Regulation of zinc-responsive Slc39a5 (Zip5) translation is mediated by conserved elements in the 3'-untranslated region, *Biometals*, 25, 319-335.
- Mocchegiani, E., Giacconi, R., Cipriano, C., and Malavolta, M. (2009) NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins, *J. Clin. Immunol.*, 29, 416-425.
- Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., et al. (2009) Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction, *J. Exp. Med.*, 206, 1351-1364.
- 10. Liu, M.-J., Bao, S., Gálvez-Peralta, M., Pyle, C. J., Rudawsky, A. C., et al. (2013) The zinc transporter SLC39A8 is a negative feedback regulator of NF- κ B through zinc-mediated inhibition of IKK, *Cell Rep.*, **3**, 386.
- Taniguchi, M., Fukunaka, A., Hagihara, M., Watanabe, K., Kamino, S., Kambe, T., Enomoto, S., and Hiromura, M. (2013) Essential role of the zinc transporter ZIP9/SLC39A9 in regulating the activations of Akt and Erk in B-cell receptor signaling pathway in DT40 cells, *PLoS One*, 8, e58022.
- Haraguchi, Y., Sakurai, H., Hussain, S., Anner, B. M., and Hoshino, H. (1999) Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds, *Antiviral Res.*, 43, 123-133.
- 13. Mocchegiani, E., and Muzzioli, M. (2000) Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections, *J. Nutr.*, **130**, 1424S-1431S.
- Bobat, R., Coovadia, H., Stephen, C., Naidoo, K. L., McKerrow, N., Black, R. E., and Moss, W. J. (2005) Safety and efficacy of zinc supplementation for children with HIV-1 infection in South Africa: a randomised doubleblind placebo-controlled trial, *Lancet*, **366**, 1862-1867.
- Baum, M. K., Lai, S., Sales, S., Page, J. B., and Campa, A. (2010) Randomized, controlled clinical trial of zinc sup-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 2 2021

plementation to prevent immunological failure in HIVinfected adults, *Clin. Infect. Dis.*, **50**, 1653-1660.

- Tang, A. M., Graham, N. M., Kirby, A. J., McCall, L. D., Willett, W. C., and Saah, A. J. (1993) dietary micronutrient intake and risk of progression to Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-infected homosexual men, *Am. J. Epidemiol.*, **138**, 937-951.
- Lee, S. P., and Han, M. K. (1996) Zinc stimulates Mg²⁺dependent 3'-processing activity of human immunodeficiency virus type 1 integrase *in vitro*, *Biochemistry*, 35, 3837-3844.
- Rice, W. G., Schaeffer, C. A., Harten, B., Villinger, F., South, T. L., et al. (1993) Inhibition of HIV-1 infectivity by zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds, *Nature*, 361, 473-475.
- Reid, W., Sadowska, M., Denaro, F., Rao, S., Foulke, J., et al. (2001) An HIV-1 transgenic rat that develops HIVrelated pathology and immunologic dysfunction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9271-9276.
- Reid, W., Abdelwahab, S., Sadowska, M., Huso, D., Neal, A., et al. (2004) HIV-1 transgenic rats develop T cell abnormalities, *Virology*, **321**, 111-119.
- Purvis, S. F., Jacobberger, J. W., Sramkoski, R. M., Patki, A. H., and Lederman, M. M. (1995) HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 11, 443-450.
- Bettaccini, A. A., Baj, A., Accolla, R. S., Basolo, F., and Toniolo, A. Q. (2005) Proliferative activity of extracellular HIV-1 Tat protein in human epithelial cells: expression profile of pathogenetically relevant genes, *BMC Microbiol.*, 5, 20.
- 23. Frankel, A. D., Bredt, D. S., and Pabo, C. O. (1988) Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer, *Science*, **240**, 70-73.
- Canani, R. B., Ruotolo, S., Buccigrossi, V., Passariello, A., Porcaro, F., Siani, M. C., and Guarino, A. (2007) Zinc fights diarrhoea in HIV-1-infected children: in-vitro evidence to link clinical data and pathophysiological mechanism, *AIDS*, 21, 108-110.
- Li, J. C., Yim, H. C., and Lau, A. S. (2010) Role of HIV-1 Tat in AIDS pathogenesis: its effects on cytokine dysregulation and contributions to the pathogenesis of opportunistic infection, *AIDS*, 24, 1609-1623.
- Matsui, M., Warburton, R. J., Cogswell, P. C., Baldwin, A. S., Jr., and Frelinger, J. A. (1996) Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 11, 233-240.
- Gherardi, R. K. (1994) Skeletal muscle involvement in HIV-infected patients, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 20, 232-237.
- Illa, I., Nath, A., and Dalakas, M. (1991) Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis, *Ann. Neurol.*, 29, 474-481.
- Belec, L., Meillet, D., Hernvann, A., Gresenguet, G., and Gherardi, R. (1994) Differential elevation of circulating interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in AIDS associated cachectic states, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1, 117-120.
- 30. Llovera, M., Garcia-Martinez, C., Agell, N., Lopez-Soriano, F. J., Authier, F. J., Gherardi, R. K., and Argiles,

J. M. (1998) Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients, *Int. J. Mol. Med.*, **2**, 69-73.

- Gonzalez-Cadavid, N. F., Taylor, W. E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., et al. (1998) Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14938-14943.
- 32. Tibaduiza, E. C., and Bobilya, D. J. (1996) Zinc transport across an endothelium includes vesicular cotransport with albumin, *J. Cell. Physiol.*, **167**, 539-547.
- Sreenivasulu, K., Raghu, P., and Nair, K. M. (2010) Polyphenol-rich beverages enhance zinc uptake and metallothionein expression in Caco-2 cells, *J. Food Sci.*, 75, H123-H128.
- Coyle, P., Zalewski, P. D., Philcox, J. C., Forbes, I. J., Ward, A. D., et al. (1994) Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc, *Biochem. J.*, 303, 781-786.
- Chen, L., Frister, A., Wang, S., Ludwig, A., Behr, H., et al. (2009) Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances interleukin-6 and MCP-1 production, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 296, H987-H996.
- Alluri, K., Nair, K. P., Kotturu, S. K., and Ghosh, S. (2020) Transcriptional regulation of zinc transporters in human osteogenic sarcoma (Saos-2) cells to zinc supplementation and zinc depletion, *Biol. Trace Elem. Res.*, 194, 360-367.
- Davis, S. R., and Cousins, R. J. (2000) Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function, *J. Nutr.*, **130**, 1085-1088.
- Alluri, K., Nair, K. P., and Ghosh, S. (2019) Differential expression of zinc transporters in functionally contrasting tissues involved in zinc homeostasis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 18, 1-5.
- Cao, J., Bobo, J. A., Liuzzi, J. P., and Cousins, R. J. (2001) Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis, *J. Leukoc. Biol.*, **70**, 559-566.
- 40. Andrews, G. K. (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions, *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 95-104.
- Langmade, S. J., Ravindra, R., Daniels, P. J., and Andrews, G. K. (2000) The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene, *J. Biol. Chem.*, 275, 34803-34809.
- Cousins, R. J., Blanchard, R. K., Popp, M. P., Liu, L., Cao, J., et al. (2003) A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6952-6957.
- Overbeck, S., Uciechowski, P., Ackland, M. L., Ford, D., and Rink, L. (2008) Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9, *J. Leuk. Biol.*, 83, 368-380.
- 44. Liuzzi, J. P., Blanchard, R. K., and Cousins, R. J. (2001) Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats, *J. Nutr.*, **131**, 46-52.

- 45. Palmiter, R. D., and Findley, S. D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *EMBO J.*, **14**, 639-649.
- Hara, T., Takeda, T. A., Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., and Fukada, T. (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis, *J. Physiol. Sci.*, 67, 283-301.
- 47. Lichten, L. A., Ryu, M.-S., Guo, L., Embury, J., and Cousins, R. J. (2011) MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction, *PLoS One*, **6**, e21526.
- Ryu, M.-S., Lichten, L. A., Liuzzi, J. P., and Cousins, R. J. (2008) Zinc transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in mouse red blood cells are differentially regulated during erythroid development and by dietary zinc deficiency, *J. Nutr.*, **138**, 2076-2083.
- Hamon, R., Homan, C. C., Tran, H. B., Mukaro, V. R., Lester, S. E., et al. (2014) Zinc and zinc transporters in macrophages and their roles in efferocytosis in COPD, *PLoS One*, 9, e110056.
- Chen, P., Mayne, M., Power, C., and Nath, A. (1997) The Tat protein of HIV-1 induces Tumor Necrosis Factor-α production implications for HIV-1-associated neurological diseases, *J. Biol. Chem.*, **272**, 22385-22388.
- Nath, A., Conant, K., Chen, P., Scott, C., and Major, E. O. (1999) Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes A hit and run phenomenon, *J. Biol. Chem.*, 274, 17098-17102.
- 52. Hojyo, S., and Fukada, T. J. (2016) Roles of zinc signaling in the immune system, *Immunol. Res.*, **2016**, 6762343, doi: 10.1155/2016/6762343.
- Lang, C. J., Murgia, C., Leong, M., Tan, L.-W., Perozzi, G., et al. (2006) Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **292**, L577-L584.
- 54. Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., et al. (2005) Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6843-6848.
- 55. Lichten, L. A., Liuzzi, J. P., and Cousins, R. J. (2009) Interleukin-1β contributes via nitric oxide to the upregulation and functional activity of the zinc transporter Zip14 (Slc39a14) in murine hepatocytes, *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.*, **296**, G860-G867.
- Kitamura, H., Morikawa, H., Kamon, H., Iguchi, M., Hojyo, S., et al. (2006) Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function, *Nat. Immunol.*, 7, 971-977.
- Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A. B. (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein, *Science*, 268, 429-431.
- Chen, D., Wang, M., Zhou, S., and Zhou, Q. (2002) HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim, *EMBO J.*, 21, 6801-6810.
- 59. Joshi, P. C., and Guidot, D. M. (2011) HIV-1 transgene expression in rats induces differential expression of tumor necrosis factor alpha and zinc transporters in the liver and the lung, *AIDS Res. Ther.*, **8**, 36.

LEVELS OF ZINC TRANSPORTERS mRNA DEPENDING ON ZINC STATUS AND HIV-1 TAT-INDUCED INFLAMMATION IN MUSCLE (RD) AND MONOCYTE (THP-1) CELL LINES*

K. Alluri¹, S. Reddy Yathapu², N. Babu Kondapalli³, R. Hemalatha³, K. M. Nair^{4*}, and S. Ghosh^{1**}

¹ Molecular Biology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; e-mail: bihongo@yahoo.com

² Drug Toxicology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India

³ Microbiology and Immunology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India

⁴ Micronutrient Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; e-mail: nairthayil@gmail.com

Monocytes and muscles demonstrate functionally contrasting behavior under conditions of zinc deficiency with relation to zinc storage system (muscle retain zinc in contrast to monocytes). We aimed to understand the effects of zinc status and HIV-1 Tat mediated inflammation on expression of zinc transporters in these types of cells. Expression of zinc transporters [ZnTs, ZIPs, and metallothionein (MT)] was quantified by qRT-PCR in RD, THP-1 cells separately and in co-cultured THP-1–RD cells. ZnT1 protein expression levels were confirmed by Western blot. Significant increase of MT and ZnT1 mRNA in response to zinc supplementation and decrease during zinc deficiency indicates significance of the genes encoding transporters in maintaining zinc homeostasis in these tissues. In the RD cells ZIP10 exhibited inverse relation to zinc status whereas no correlation was found in the THP-1 cells. Tatinduced inflammation resulted in the significant elevation of MT, IL6, ZIP7, ZIP8, ZIP9 transcripts in the co-cultured RD cells, whereas THP-1 cells demonstrated increased IL-1 β levels and reduced levels of ZIP7 and ZIP14. Zinc status and HIV-1Tat induced inflammation appear to influence differential expression of MT, ZnTs, and ZIP3 in the muscle and monocyte cells.

Keywords: zinc transporters, ZIPs, ZnTs, co-culture, HIV-1 Tat, THP-1, RD