БИОХИМИЯ, 2022, том 87, вып. 11, с. 1700 – 1708

УДК 577.218

АДИПОНЕКТИН СТИМУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА АПОЛИПОПРОТЕИНА A-1 В КЛЕТКАХ HepG2 ЧЕРЕЗ СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ AMPK, PPAR-АЛЬФА И LXR

© 2022 Д.А. Танянский[1,2]*, В.С. Шавва[1], Э.Б. Диже[1], Г.Н. Олейникова[1], А.В. Лизунов[1,3], Е.В. Некрасова[1], Д.А. Могиленко[1], Е.Е. Ларионова[1], С.В. Орлов[1,3], А.Д. Денисенко[1,2]

[1] *Институт экспериментальной медицины, отдел биохимии, 197376 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: dmitry.athero@gmail.com*

[2] *Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий, 199034 Санкт-Петербург, Россия*

[3] *Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра эмбриологии, 199034 Санкт-Петербург, Россия*

Поступила в редакцию 19.09.2022
После доработки 19.09.2022
Принята к публикации 06.10.2022

Адипонектин – гормон жировой ткани, регулирующий энергетический обмен и оказывающий влияние на атерогенез. Ранее было установлено, что адипонектин повышает экспрессию гена *APOA1* (аполипопротеин A-1) в гепатоцитах, однако механизмы этого влияния оставались неизученными. Целью работы было выяснить участие рецепторов адипонектина AdipoR1/R2, AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK), ядерных рецепторов PPARα (рецепторы активаторов пролиферации пероксисом-альфа) и LXR (печёночные X-рецепторы) в опосредовании действия адипонектина на экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах. Исследование проводили на клетках гепатомы человека HepG2. Уровень экспрессии гена *APOA1* определяли с помощью ОТ-ПЦР и ИФА. Выяснилось, что нокдаун генов, кодирующих AdipoR1/R2, AMPK, активирующую её киназу LKB-1 (печёночная киназа B1), а также ядерные рецепторы PPARα и LXR, предотвращал индуцированную адипонектином экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2. В опытах с трансфекцией клеток HepG2 плазмидами было установлено, что активация адипонектином транскрипции гена *APOA1* зависит от взаимодействия PPARα и LXR с сайтами A и C гепатоцитарного энхансера. Результаты данного исследования свидетельствуют об участии обоих типов рецепторов адипонектина, AMPK, PPARα и LXR в регуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адипонектин, аполипопротеин A-1, гепатоциты, AMPK, ядерные рецепторы.

DOI: 10.31857/S0320972522110148, **EDN:** LWZAYX

ВВЕДЕНИЕ

Ожирение и обусловленные им расстройства, такие как инсулинорезистентность, дислипидемия, гипертензия (симптомокомплекс, именуемый метаболическим синдромом (МС)), являются одними из широко распространённых патогенетических факторов риска развития атеросклероза. Считается, что гормоны жировой ткани, или адипокины, участвуют в патогенезе МС и сердечно-сосудистых заболеваний [1]. В отличие от большинства адипокинов, адипонектин обладает противовоспалительными свойствами, повышает инсулинчувствительность, уменьшает дислипопротеинемию [1-4]. Согласно клиническим наблюдениям, содержание адипонектина в плазме положительно коррелирует с уровнем холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) и отрицательно – с концентрацией триглицеридов в плазме [5, 6]. Указанная взаимосвязь между концентрациями в плазме ади-

Принятые сокращения: апоA-1 – аполипопротеин A-1; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; миРНК – малые интерферирующие РНК; ОТ-ПЦР – ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией; AdipoR – рецепторы к адипонектину; AICAR – 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид; AMPK – AMP-активируемая протеинкиназа; HE – гепатоцитарный энхансер; HNF4α – ядерный фактор гепатоцитов 4α; LKB-1 – печёночная киназа B1; LXR – печёночные X-рецепторы; PPARα – рецепторы активаторов пролиферации пероксисом; TNF-α – фактор некроза опухолей.

* Адресат для корреспонденции.

понектина и холестерина ЛПВП, вероятно, обусловлена влиянием адипокина на метаболизм триглицеридов [4], в то время как воздействие адипонектина на выработку гепатоцитами аполипопротеина А-1 (апоА-1), основного белка ЛПВП, является спорным [2, 3] и требует дальнейшего изучения.

Продукция клетками апоА-1 определяется главным образом активностью транскрипции, которая регулируется взаимодействием транскрипционных факторов со специфическими сайтами в 5'-регуляторной области гена *APOA1*. Эта область, названная гепатоцитарным энхансером (HE, позиции −222... −110 п.н. относительно точки инициации транскрипции), состоит из трёх регуляторных участков: A (−214... −192), B (−169... −146) и C (−134... −119). Сайты A и C содержат консенсусные мотивы для связывания факторов транскрипции, принадлежащих к суперсемейству ядерных рецепторов. Рецепторы активаторов пролиферации пероксисом-альфа (PPARα) и ядерный фактор гепатоцитов 4α (HNF4α) активируют транскрипцию гена *APOA1*, взаимодействуя с сайтом A [7, 8]. Печёночные X-рецепторы (LXRα и LXRβ) и PPARγ подавляют, в то время как HNF4α повышает экспрессию гена *APOA1*, связываясь с сайтом C [7, 9, 10]. С сайтом B взаимодействуют FOXA2 (forkhead box protein A2), активатор транскрипции гена *APOA1* [11], и FOXO1, репрессор гена *APOA1* [12].

Ранее нами было показано, что фактор некроза опухоли альфа (TNF-α) и инсулин, концентрации которых повышены в плазме крови у пациентов с МС, оказывают влияние на экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах [13, 14]. TNF-α подавляет экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах, повышая связывание LXRβ с сайтом C и снижая взаимодействие PPARα с сайтом A HE [13]. Инсулин подавляет экспрессию гена *APOA1,* увеличивая связывание LXRα с сайтом C и уменьшая взаимодействие FOXA2 с сайтом B указанного регуляторного элемента [14].

Гепатоциты экспрессируют два типа рецепторов адипонектина, AdipoR1 и AdipoR2 [15], взаимодействующих с несколькими молекулярными формами адипонектина [16, 17]. AdipoR1 связывается с тримерным адипонектином, в то время как AdipoR2 взаимодействует с три-, гекса- и мультимерными формами адипокина [17]. Адипонектин, связываясь с AdipoR1, стимулирует AMP-активируемую протеинкиназу (AMPK), а после связывания с AdipoR2 активирует PPARα-зависимые пути [18]. Не имея гомологии с рецепторами, связанными с G-белками, AdipoR1/2 передают сигналы, взаимодействуя с адаптерным белком APPL1. Этот адаптер вызывает перемещение печёночной киназы B1 (LKB-1) из ядра в цитозоль, где LKB-1 фосфорилирует AMPK по остатку Thr-172, что приводит к активации фермента [19]. Механизм активации PPARα адипонектином недостаточно изучен, но, по крайней мере, частично PPARα может быть активирован посредством AMPK-зависимого фосфорилирования [20]. Активатор AMPK AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид) подавляет транскрипцию гена *APOA1* в гепатоцитах человека, вероятно, путём ингибирования экспрессии HNF4α и его активности [21]. Поскольку AMPK, помимо HNF4α, также регулирует активность PPARα и LXRα [20, 22], его влияние на транскрипцию *APOA1* может быть сложным. Адипонектин ингибирует активность HNF4α в гепатоцитах человека, но, в отличие от AICAR, его влияние на экспрессию гена *APOA1* в гепатоцитах не коррелирует с изменением уровня HNF4α в данных клетках [3, 4].

Роль AMPK, PPARα и LXR в активации адипонектином экспрессии гена *APOA1* в гепатоцитах на настоящий момент не изучена. Выяснение данного вопроса и является целью настоящего исследования. Некоторые предварительные данные о регуляции адипонектином продукции аполипопротеинов гепатоцитами были представлены нами ранее [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Клетки линии гепатомы человека HepG2 (ЦКП «Коллекция клеточных культур позвоночных» Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM с добавлением 4 мМ L-глутамина, 0,1 мг/мл гентамицина («Биолот», Россия) и 10%-ной (*v/v*) фетальной телячьей сыворотки (FCS) («HyClone», США) в 5%-ном CO_2 при 37 °C, как описано ранее [14]. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 1×10^4 клеток/см^2 и выращивали в полной среде в течение 2–3 дней до достижения субконфлуентности. Далее среду заменяли на среду без сыворотки с добавлением 10 либо 30 мкг/мл адипонектина (смесь три-, гекса- и мультимеров, рис. 1 Приложения, «Biovendor», Чехия, продуцент – клетки линии HEK293), либо 1 мМ AICAR («Calbiochem», США), либо фосфатно-солевого буфера (PBS, «Биолот») и инкубировали 24 ч. После этого клетки снимали для определения экспрессии исследуемых генов и белка апоА-1.

Плазмиды. В экспериментах использовали следующие плазмидные конструкции: pCMV-lacZ, содержит последовательности промотора ранних генов цитомегаловируса человека и бактериального репортёрного гена β-галактозидазы *LacZ* [24]; pA1(−256/+72)-Luc (pA1-Luc), содержит репортёрный ген люциферазы светлячка под контролем НЕ (позиции от −256 до +72 относительно сайта инициации транскрипции гена *APOA1* человека) [25]; pA1-Luc с мутациями в сайтах А или С НЕ [10].

Трансфекция клеток и репортёрный анализ. Трансфекции клеток HepG2 плазмидными конструкциями осуществляли с использованием реагента Липофектамин-3000 («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки трансфицировали 420 нг нативной либо мутированной ДНК pA1-Luc на лунку 96-луночного планшета. Для контроля эффективности трансфекции клетки котрансфицировали 80 нг ДНК pCMV-lacZ на лунку. На следующий день среду заменяли на среду, не содержащую FCS, с добавлением 10 мкг/мл адипонектина или PBS на 24 ч. После этого клетки лизировали и определяли активность люциферазы [10] и β-галактозидазы [24] в клеточных экстрактах. Относительная активность люциферазы (%) рассчитывалась как отношение интенсивности света в течение 1 мин на 1 мг общего клеточного белка к значению данного показателя в контрольных клетках (100% в контрольных клетках). Концентрацию общего белка в клеточных лизатах определяли бицинхониниовым методом («Thermo Fisher Scientific»).

РНК-интерференция. МиРНК против *ADIPOR1*, *ADIPOR2* [15], *STK11* (LKB-1) [26] и *PRKAA1/2* (α1- и α2-субъединицы AMPK) [12] были приобретены у «Синтол» (Россия). МиРНК против *PPARA* (PPARα) (sc-36307), *NR1H3* (LXRα) (sc-38828), *NR1H2* (LXRβ) (sc-45316) и неспецифические контрольные олигонуклеотиды миРНК (sc-37007) были приобретены в «Santa Cruz Biotechnology» (США).

Трансфекции клеток HepG2 миРНК осуществляли с использованием реагента Липофектамин RNAiMAX («Invitrogen», США) в соответствии с рекомендациями производителя в течение 72 ч. В последние 24 ч трансфекции клетки инкубировали с добавлением 10 мкг/мл адипонектина, либо 1 мм AICAR, либо PBS в условиях без сыворотки.

Выделение РНК и количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Общую РНК выделяли из клеток HepG2 с помощью реактива «TRI Reagent» («Ambion», США) в соответствии с протоколом производителя. 0,5–1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции с использованием набора для обратной транскриптазы M-MLV («Promega», США) с добавлением праймеров dT16 («Синтол»). ОТ-ПЦР проводили, как описано ранее [10]. Праймеры и зонды для *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARA* [13], *ABCA1* [27], *ACTB* (β-актин) [28], *RPLP0*, *PPIA* (циклофилин А) [14], *PRKAA1* и *PRKAA2* [12] были описаны ранее. Праймеры для *G6PC1* (глюкозо-6-фосфатаза): 5'-CTCAACCTCGTCTTTAAGTGGAT-3', 5'-CCTGGTCCAGTCTCACAGGT-3'; *ADIPOR1*: 5'-CCTGGAAAATTTGACATATGGTTC-3', 5'-AGGCTCAGAGAAGGGTGTCA-3'; *ADIPOR2*: 5'-CGGGGAGTAAGAGCAGGAG-3', 5'-GGGCAGCTCCTGTGATGTAG-3'; *STK11*: 5'-TCTGACCTGCTGAAAGGGA-3', 5'-GTGCAGGTCCTCCAAGTACG-3' были подобраны с использованием программы Primer3 (https://primer3.ut.ee/). Относительное содержание мРНК генов-мишеней нормировали на среднее геометрическое содержания мРНК референс-генов *RPLP0*, *PPIA* и *ACTB* и определяли методом ΔΔCt, принимая за 100% уровень экспрессии гена в группе контроля.

ИФА. Содержание апоА-1 в клетках HepG2 определяли методом сэндвич-ИФА, как описано ранее [29].

Статистика. Результаты представлены в виде средних значений ± SEM (стандартная ошибка среднего) по меньшей мере 3–4 независимых экспериментов. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами проводили с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента, либо критерия Даннета для множественных сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистические анализы выполняли с использованием программы Statistica 6.0 («StatSoft», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 через НЕ. Ранее было показано, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 [2, 4], но не в первичных гепатоцитах человека [3]. Согласно результатам нашего исследования, адипонектин вызывал повышение уровней мРНК *APOA1*, а также белка апоА-1 в клетках HepG2 (рис. 1, *а*, *б*). AICAR, активатор AMPK, также индуцировал увеличение содержания мРНК *APOA1* в этих клетках, в то время как оба агента снижали уровень мРНК *G6PC1*, их известной мишени [30] (рис. 1, *а*). При этом ни адипонектин, ни AMPK не оказывали влияния на со-

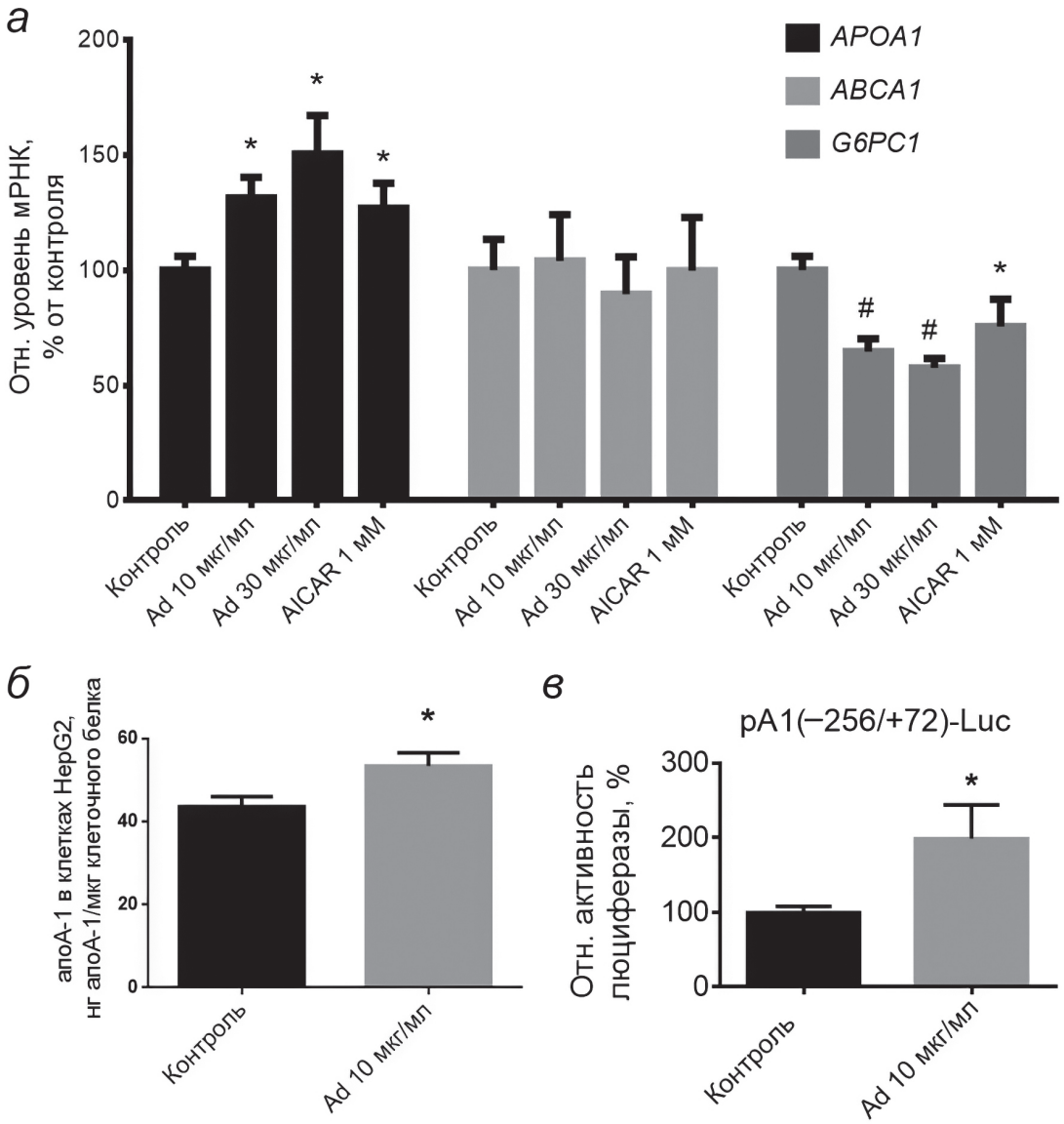

Рис. 1. Влияние адипонектина (Ad) на экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2. Клетки в бессывороточных условиях инкубировали в течение 24 ч с адипонектином либо с AICAR в указанных концентрациях. *а* – ОТ-ПЦР относительного содержания мРНК *APOA1*, *ABCA1* и *G6PC1*. Приведены средние ± SEM (n = 16–20). *p < 0,05, #p < 0,001 по сравнению с контролем в соответствии с критерием Даннета. *б* – Содержание белка апоА-1 в клетках HepG2. Средние ± SEM (n = 7). * p < 0,05 по сравнению с контрольными клетками в соответствии с t-критерием Стьюдента. *в* – Относительная активность люциферазы в клетках HepG2 после их трансфекции плазмидами, несущими гены люциферазы под контролем НЕ (pA1[−256/+72]). Средние ± SEM (n = 12). * p < 0,05 по сравнению с контролем в соответствии с t-критерием Стьюдента

держание в клетках мРНК *ABCA1* (рис. 1, *а*), другого белка, участвующего в формировании ЛПВП, а также не влияли на активацию регуляторного элемента гена, кодирующего этот белок (рис. 2 Приложения).

Ранее нами было показано, что TNF-α и инсулин влияют на транскрипцию гена *APOA1* через НЕ, основной регуляторный элемент данного гена [13, 14]. Чтобы определить, действует ли адипонектин на экспрессию *APOA1* через указанный элемент, клетки HepG2 были трансфицированы плазмидами pA1(−256/+72)-Luc, несущими репортёрный ген люциферазы под контролем НЕ. Было обнаружено, что адипонектин стимулировал экспрессию данного гена (рис. 1, *в*). В связи с этим мы предполагаем, что адипонектин увеличивает экспрессию гена *APOA1* на транскрипционном уровне, действуя через НЕ.

Роль рецепторов адипонектина, киназ LKB-1 и AMPK и ядерных рецепторов PPARα, LXRα и LXRβ в регуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1*. Для идентификации сигнальных путей, принимающих участие в регуляции адипонектином транскрипции гена *APOA1*, мы использовали технологию РНК-интерференции.

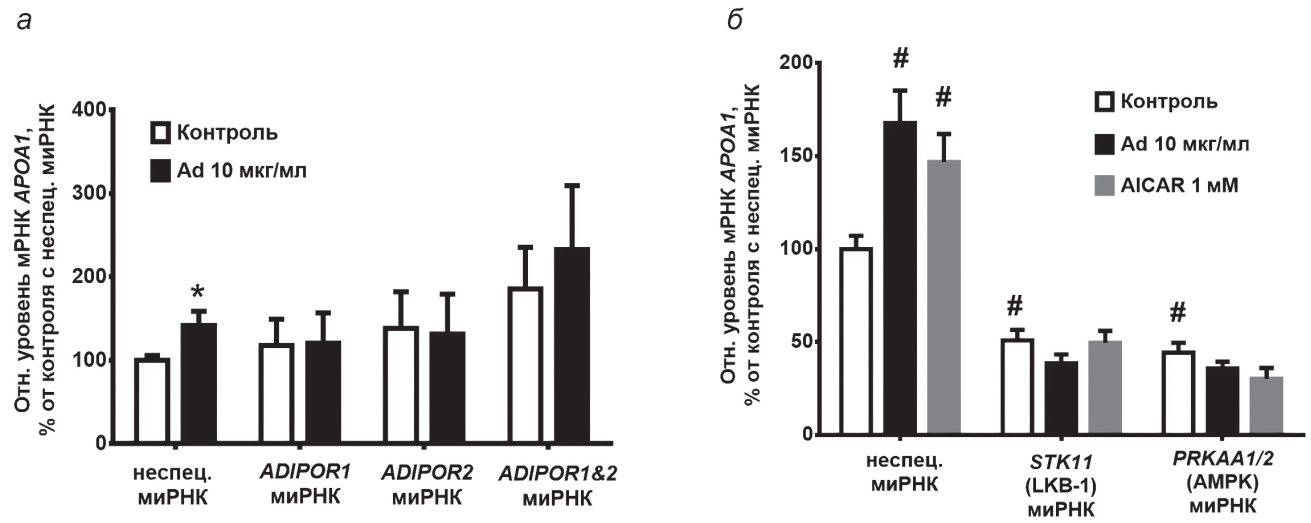

Рис. 2. Участие рецепторов адипонектина AdipoR1/R2 (*а*) и киназ LKB-1/AMPK (*б*) в стимуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1* в клетках HepG2. Клетки трансфицировали смешанной либо специфической миРНК в течение 72 ч. Последние 24 ч клетки инкубировали с 10 мкг/мл адипонектина (Ad) либо с 1 мм AICAR. Представлены результаты ОТ-ПЦР относительного содержания мРНК *APOA1*. Приведены средние ± SEM ($n = 8$). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем в соответствии с непарным *t*-критерием Стьюдента, # $p < 0,05$ по сравнению с контролем в соответствии с критерием Даннета

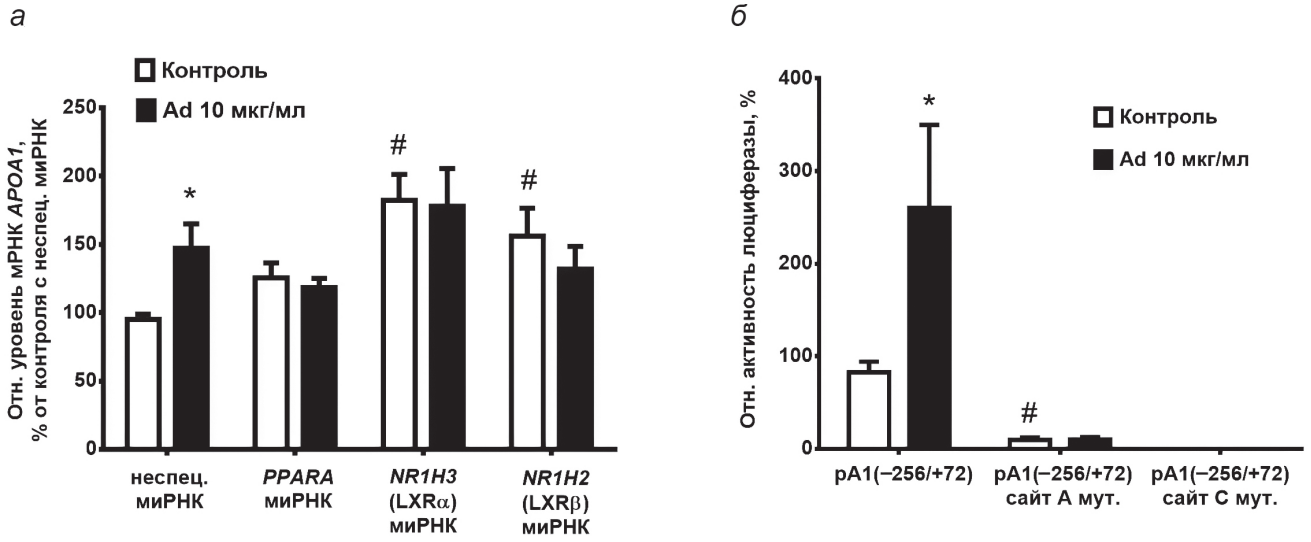

Рис. 3. Участие ядерных рецепторов PPARα, LXRα и LXRβ в стимуляции адипонектином экспрессии гена *APOA1* в клетках HepG2. Клетки трансфицировали миРНК к генам исследуемых рецепторов в течение 72 ч (*а*), либо плазмидами pA1(−256/+72), либо плазмидами pA1(−256/+72) с мутациями в сайте A, либо C в течение 48 ч (*б*). Последние 24 ч клетки инкубировали с 10 мкг/мл адипонектина. *а* – ОТ-ПЦР относительного содержания мРНК *APOA1*, *б* – относительная активность люциферазы. Приведены средние ± SEM (*а* – $n = 8$, *б* – $n = 5$). Остальные обозначения как в подписи к рис. 2

Клетки HepG2 были трансфицированы либо смешанной неспецифической миРНК, либо миРНК против генов обоих типов рецепторов адипонектина, AdipoR1 и AdipoR2, и нижестоящих сигнальных молекул, таких как киназы LKB-1 и AMPK, а также ядерных рецепторов PPARα и LXR. Нокдаун генов-мишеней был подтверждён методом ОТ-ПЦР (рис. 3 Приложения). Эффективность нокдауна некоторых генов (*PRKAA1*, *PRKAA2*, *PPARA*, *NR1H3* [12, 31], *NR1H2* [рис. 4 Приложения]) была подтверждена также методом Вестерн-блоттинга.

Нокдаун обоих типов рецепторов адипонектина не влиял на транскрипцию гена *APOA1* в клетках HepG2, но устранял влияние адипонектина на экспрессию данного гена (рис. 2, *а*). В связи с этим мы предполагаем, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* посредством взаимодействия адипокина с рецепторами обоего типа.

Нокдаун генов *PRKAA1* и *PRKAA2* (обеих каталитических субъединиц AMPK) и гена её вышестоящей киназы LKB-1 также приводил к отмене влияния адипонектина на экспрес-

сию гена *APOA1* (рис. 2, *б*). Более того, нокдаун обеих киназ вызывал значительное уменьшение экспрессии гена *APOA1* (рис. 2, *б*), что свидетельствует о важной роли AMPK в регуляции экспрессии данного гена и согласуется со стимулирующим действием AICAR на уровень мРНК *APOA1* (рис. 1, *а* и рис. 2, *б*). Последний эффект отменялся после нокдауна генов *STK11* (LKB-1) либо *PRKAA1/2* (рис. 2, *б*), что указывает на то, что влияние AICAR на транскрипцию гена *APOA1* являлось AMPK-зависимым.

Далее мы изучили роль ядерных рецепторов в регуляции адипонектином транскрипции гена *APOA1*. Нокдаун *PPARA*, *NR1H3* (LXRα) либо *NR1H2* (LXRβ) вызывал отмену влияния адипонектина на экспрессию *APOA1* (рис. 3, *а*). Повышение содержания мРНК *APOA1* после нокдауна обоих типов LXR может быть результатом удаления ингибирующего сигнала LXR на транскрипцию данного гена.

Чтобы выявить, опосредовано ли действие адипонектина на транскрипцию гена *APOA1* взаимодействием ядерных рецепторов с HE, мы трансфицировали клетки HepG2 плазмидами pA1 (−256/+72), в которых были произведены мутации сайта A либо сайта C. PPARα связывается с сайтом A [8], в то время как LXR связываются с сайтом C [9]. Трансфекция клеток HepG2 плазмидами, мутированными по сайту A, приводила к 10-кратному снижению экспрессии репортёрного гена и к отмене влияния адипонектина на его экспрессию, в то время как плазмиды с мутациями в сайте C были полностью лишены активности (рис. 3, *б*). Эти данные свидетельствуют о том, что влияние адипонектина на транскрипцию гена *APOA1* зависит от связывания PPARα и LXR с HE.

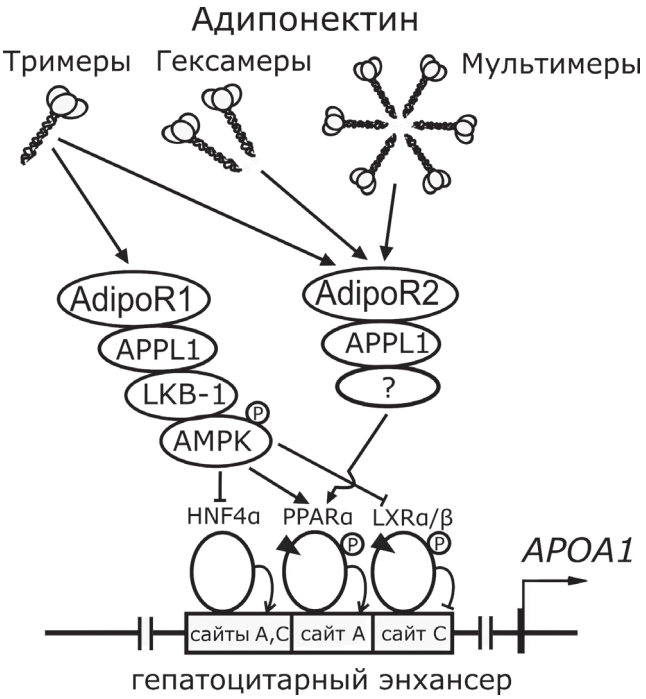

Рис. 4. Возможный механизм индуцированной адипонектином экспрессии гена *APOA1* в клетках HepG2. Взаимодействуя преимущественно с AdipoR1, тримеры адипонектина активируют киназу LKB-1 и далее AMPK. Ингибируя активность HNF4α, повышая активность PPARα (оба – активаторы HE) и ингибируя активность LXR (репрессоры гена *APOA1*), AMPK в итоге стимулирует активность HE. Связавшись с AdipoR2, все молекулярные формы адипонектина активируют PPARα по AMPK-независимому механизму. APPL1 – белковый адаптер, привлекающий сигнальные молекулы к AdipoRs. Стрелки обозначают сигналы активации, а линии с тупым концом – сигналы ингибирования. Заключённый в окружность знак P обозначает фосфорилирование

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В более ранних исследованиях было показано, что адипонектин стимулирует выработку апоA-1 и ABCA-1 (АТР-связывающего кассетного транспортёра A1) в клетках HepG2 [2, 4], но эти результаты не подтверждались в первичных гепатоцитах человека [3]. Наблюдаемые расхождения могут объясняться различиями между типами клеток, концентрациями, источниками и молекулярными формами адипонектина. В нашем исследовании мы инкубировали клетки HepG2 с адипонектином, полученным из клеток HEK293, представляющим собой смесь мультимеров, гексамеров и тримеров (рис. 1 Приложения). По нашим данным, адипонектин как в высоких (30 мкг/мл), так и в умеренных (10 мкг/мл) концентрациях повышал экспрессию гена *APOA1*, что сопровождалось увеличением содержания в клетках белка апоA-1. Эксперименты с РНК-интерференцией показали, что оба типа рецепторов, AdipoR1 и AdipoR2, опосредуют влияние адипонектина на экспрессию гена *APOA1*. Поскольку AdipoR1 преимущественно связывается с тримерными формами адипонектина, в то время как AdipoR2 взаимодействует с три-, гекса- и мультимерами [17], мы предполагаем, что все типы форм данного адипокина регулируют экспрессию гена *APOA1* (рис. 4).

AdipoR1 опосредует эффекты адипонектина, стимулируя AMPK через APPL-1-зависимое связывание и активацию киназы LKB-1 [18, 19]. Наши эксперименты с активацией (добавление AICAR) и ингибированием AMPK (РНК-интерференция) показывают, что влияние адипонектина на экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 опосредуется участием данной киназы. Однако, вопреки

нашим наблюдениям, ранее было показано, что AICAR подавляет экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 [21], но не в первичных гепатоцитах человека [32]. Возможно, итоговое влияние AMPK на транскрипцию гена *APOA1* является сложным и определяется действием киназы на активность различных активаторов (HNF4α [21, 32], PPARα [20]) и репрессоров (LXRα [22]) транскрипции этого гена. В целом наши результаты свидетельствуют о том, что адипонектин стимулирует экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 через активацию AMPK.

Другим способом передачи сигналов адипонектина является активация PPARα – путь, зависимый в основном от AdipoR2 [18]. Ранее мы показали, что TNF-α подавляет экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2 посредством активации LXR и ингибирования PPARα [13]. В настоящем исследовании, используя трансфекции клеток HepG2 миРНК и плазмидными конструкциями, мы показали, что оба типа ядерных рецепторов участвуют в стимуляции адипонектином транскрипции гена *APOA1*. Активность PPARα может быть увеличена путём AMPK-зависимого фосфорилирования, в то время как активность LXRα ингибируется при фосфорилировании этим ферментом [20, 22] (рис. 4). В свою очередь, активация AMPK адипонектином осуществляется через AdipoR1 [18]. Помимо указанного пути, в активации PPARα также участвуют AdipoR2 [18]; механизм передачи данного сигнала остаётся неизвестным (рис. 4).

Таким образом, в настоящем исследовании впервые выяснен механизм, с помощью которого адипонектин повышает экспрессию гена *APOA1* в клетках HepG2. Показано, что влияние адипонектина на экспрессию гена *APOA1* опосредуется участием обоих типов адипонектиновых рецепторов, AdipoR1 и AdipoR2, активацией киназ LKB-1 и AMPK и взаимодействием PPARα и LXR с сайтами A и C HE.

Вклад авторов. Д.А. Танянский, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко – концепция и руководство работой; Д.А. Танянский, В.С. Шавва, Э.Б. Диже, Г.Н. Олейникова, А.В. Лизунов, Е.В. Некрасова, Д.А. Могиленко, Е.Е. Ларионова, С.В. Орлов – проведение экспериментов; Д.А. Танянский, В.С. Шавва, Д.А. Могиленко, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко – обсуждение результатов исследования; Д.А. Танянский – написание текста; Д.А. Танянский, С.В. Орлов, А.Д. Денисенко – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа была частично поддержана Российским научным фондом (эксперименты с трансфекцией клеток миРНК и плазмидами, грант № 17-15-01326).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (https://biochemistrymoscow.com).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berg, A. H., and Scherer, P. E. (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease, *Circ. Res.*, **96**, 939-949, doi: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34.
2. Matsuura, F., Oku, H., Koseki, M., Sandoval, J.C., Yuasa-Kawase, M., et al. (2007) Adiponectin accelerates reverse cholesterol transport by increasing high density lipoprotein assembly in the liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 1091-1095, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.05.040.
3. Neumeier, M., Sigruener, A., Eggenhofer, E., Weigert, J., Weiss, T. S., et al. (2007) High molecular weight adiponectin reduces apolipoprotein B and E release in human hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 543-548, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.11.058.
4. Qiao, L., Zou, C., van der Westhuyzen, D. R., and Shao, J. (2008) Adiponectin reduces plasma triglyceride by increasing VLDL triglyceride catabolism, *Diabetes*, **57**, 1824-1833, doi: 10.2337/db07-0435.
5. Tanyanskiy, D. A., Martynikhin, I. A., Rotar, O. P., Konradi, A. O., Sokolian, N. A., et al. (2015) Association of adipokines with metabolic disorders in patients with schizophrenia: results of comparative study with mental healthy cohort, *Diabetes Metab. Syndr.*, **9**, 163-167, doi: 10.1016/j.dsx.2015.04.009.
6. Tschritter, O., Fritsche, A., Thamer, C., Haap, M., Shirkavand, F., et al. (2003) Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism, *Diabetes*, **52**, 239-243, doi: 10.2337/diabetes.52.2.239.
7. Malik, S., and Karathanasis, S. K. (1996) TFIIB-directed transcriptional activation by the orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4, *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1824-1831, doi: 10.1128/mcb.16.4.1824.
8. Martin, G., Duez, H., Blanquart, C., Berezowski, V., Poulain, P., et al. (2001) Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and

induces HDL apoA-I, *J. Clin. Invest.*, **107**, 1423-1432, doi: 10.1172/JCI10852.

9. Huuskonen, J., Vishnu, M., Chau, P., Fielding, P. E., and Fielding, C. J. (2006) Liver X receptor inhibits the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 by human liver-derived cells, *Biochemistry*, **45**, 15068-15074, doi: 10.1021/bi061378y.
10. Shavva, V. S., Mogilenko, D. A., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., et al. (2016) PPARγ represses apolipoprotein A-I gene but impedes TNFα-mediated ApoA-I downregulation in HepG2 Cells, *J. Cell. Biochem.*, **117**, 2010-2022, doi: 10.1002/jcb.25498.
11. Harnish, D. C., Malik, S., Kilbourne, E., Costa, R., and Karathanasis, S. K. (1996) Control of apolipoprotein AI gene expression through synergistic interactions between hepatocyte nuclear factors 3 and 4, *J. Biol. Chem.*, **271**, 13621-13628, doi: 10.1074/jbc.271.23.13621.
12. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., et al. (2017) FOXO1 and LXRα 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.
13. Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Shavva, V. S., Lapikov, I. A., Orlov, S. V., et al. (2009) Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells, *Biochemistry*, **48**, 11950-11960, doi: 10.1021/bi9015742.
14. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Nikitin, A. A., Dizhe, E. B., Tanyanskiy, D. A., et al. (2017) Insulin-mediated downregulation of apolipoprotein A-I gene in Human hepatoma cell line HepG2: the role of interaction between FOXO1 and LXRβ transcription factors, *J. Cell. Biochem.*, **118**, 382-396, doi: 10.1002/jcb.25651.
15. Wanninger, J., Neumeier, M., Weigert, J., Bauer, S., Weiss, T. S., et al. (2009) Adiponectin-stimulated CXCL8 release in primary human hepatocytes is regulated by ERK1/ERK2, p38 MAPK, NF-kappaB, and STAT3 signaling pathways, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **297**, G611-G618, doi: 10.1152/ajpgi.90644.2008.
16. Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., et al. (2003) Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin, *J. Biol. Chem.*, **278**, 40352-40363, doi: 10.1074/jbc.M300365200.
17. Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., et al. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects, *Nature*, **423**, 762-769, doi: 10.1038/nature01705.
18. Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., et al. (2007) Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions, *Nat. Med.*, **13**, 332-339, doi: 10.1038/nm1557.
19. Deepa, S. S., Zhou, L., Ryu, J., Wang, C., Mao, X., et al. (2011) APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKCzeta signaling pathway, *Mol. Endocrinol.*, **25**, 1773-1785, doi: 10.1210/me.2011-0082.
20. Lee, J., Hong, S. W., Park, S. E., Rhee, E. J., Park, C. Y., et al. (2015) AMP-activated protein kinase suppresses the expression of LXR/SREBP-1 signaling-induced ANGPTL8 in HepG2 cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **414**, 148-155, doi: 10.1016/j.mce.2015.07.031.
21. Prieur, X., Schaap, F. G., Coste, H., and Rodríguez, J. C. (2005) Hepatocyte nuclear factor-4alpha regulates the human apolipoprotein AV gene: identification of a novel response element and involvement in the control by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha, AMP-activated protein kinase, and mitogen-activated protein kinase pathway, *Mol. Endocrinol.*, **19**, 3107-3125, doi: 10.1210/me.2005-0048.
22. Hwahng, S. H., Ki, S. H., Bae, E. J., Kim, H. E., and Kim, S. G. (2009) Role of adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones, *Hepatology*, **49**, 1913-1925, doi: 10.1002/hep.22887.
23. Tanyanskiy, D. A., Dizhe, E. B., Oleinikova, G. N., Shavva, V. S., and Denisenko, A. D. (2021) Mechanisms of the influence of adiponectin on apolipoproteins A-1 and B production by human hepatocytes, *Med. Acad. J.*, **21**, 39-45, doi: 10.17816/MAJ62892.
24. Dizhe, E. B., Ignatovich, I. A., Burov, S. V., Pohvoscheva, A. V., Akifiev, B. N., et al. (2006) Complexes of DNA with cationic peptides: conditions of formation and factors effecting internalization by mammalian cells, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1350-1356, doi: 10.1134/s0006297906120108.
25. Lapikov, I. A., Mogilenko, D. A., Dizhe, E. B., Ignatovich, I. A., Orlov, S. V., et al. (2008) Ap1-like cis-elements in 5'-regulatory region of human apolipoprotein A-I gene, *Mol. Biol. (Mosk)*, **42**, 295-305, doi: 10.1134/S002689330802012X.
26. Stahmann, N., Woods, A., Carling, D., and Heller, R. (2006) Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5933-5945, doi: 10.1128/MCB.00383-06.
27. Mogilenko, D. A., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., Orlov, S. V., and Perevozchikov, A. P. (2010) PPARγ 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.

28. Mogilenko, D. A., Kudriavtsev, I. V., Trulioff, A. S., Shavva, V. S., Dizhe, E. B., et al. (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.
29. Tanyanskiy, D. A., Trulioff, A. S., Ageeva, E. V., Nikitin, A. A., Shavva, V. S., et al. (2021) The Influence of adiponectin on production of apolipoproteins A-1 and E by human macrophages, *Mol. Biol.*, **55**, 637-643, doi: 10.1134/S0026893321030122.
30. Miller, R. A., Chu, Q., Le Lay, J., Scherer, P. E., Ahima, R. S., et al. (2011) Adiponectin suppresses gluconeogenic gene expression in mouse hepatocytes independent of LKB1-AMPK signaling, *J. Clin. Invest.*, **121**, 2518-2528, doi: 10.1172/JCI45942.
31. Shavva, V. S., Bogomolova, A. M., Efremov, A. M., Trofimov, A. N., Nikitin, A. A., et al. (2018) Insulin downregulates C3 gene expression in human HepG2 cells through activation of PPARγ, *Eur. J. Cell Biol.*, **97**, 204-215, doi: 10.1016/j.ejcb.2018.03.001.
32. Leclerc, I., Lenzner, C., Gourdon, L., Vaulont, S., Kahn, A., et al. (2001) Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase, *Diabetes.*, **50**, 1515-1521, doi: 10.2337/diabetes.50.7.1515.

ADIPONECTIN STIMULATES APOLIPOPROTEIN A-1 GENE EXPRESSION IN HepG2 CELLS VIA AMPK, PPAR-ALPHA, AND LXR SIGNALLING MECHANISMS

D. A. Tanyanskiy[1,2]*, V. S. Shavva[1], E. B. Dizhe[1], G. N. Oleinikova[1], A. V. Lizunov[1,3], E. V. Nekrasova[1], D. A. Mogilenko[1], E. E. Larionova[1], S. V. Orlov[1,3], and A. D. Denisenko[1,2]

[1] *Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, 197376 St. Petersburg, Russia; e-mail: dmitry.athero@gmail.com*

[2] *Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technologies, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia*

[3] *Department of Embryology, St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia*

Adiponectin is an adipose tissue hormone, participating in energy metabolism and involving in atherogenesis. Previously, it was found that adiponectin increases the expression of the *APOA1* gene (apolipoprotein A-1) in hepatocytes, but the mechanisms of this effect remained unexplored. Our aim was to investigate the involvement of adiponectin receptors AdipoR1/R2, AMP-activated protein kinase (AMPK), and nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) and liver X receptors (LXRs) in mediating of adiponectin action on hepatic *APOA1* gene expression. The human hepatoma HepG2 cells were used for this purpose. The expression level of *APOA1* was determined by using RT-PCR and ELISA. We showed that siRNA knockdown of genes coding AdipoR1 and AdipoR2, AMPK, PPARα, and LXRs α and β prevented adiponectin-induced *APOA1* gene expression in HepG2 cells. Plasmids transfection studies revealed that interaction of PPARα and LXRs with the *APOA1* gene hepatic enhancer is important for adiponectin-dependent *APOA1* gene transcription. The results of this study point out to the involvement of both types of adiponectin receptors, AMPK, PPARα and LXRs in the adiponectin-dependent up-regulation of *APOA1* gene expression.

Keywords: adiponectin, apolipoprotein A-1, hepatocytes, AMPK, nuclear receptors