

РОЛЬ БЕЛКА DRP1, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ФРАГМЕНТАЦИЮ МИТОХОНДРИЙ, В ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ВЗРЫВЕ И НЕТОЗЕ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2019 г. Н. В. Воробьева^{1*}, В. В. Кулаков²

*E-mail: nvvorobjeva@mail.ru

¹МГУ имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия;

²Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 02.04.2019

Митохондрии нейтрофилов находятся в состоянии динамического равновесия, которое поддерживается двумя противоположными процессами: слиянием и фрагментацией. Многочисленные исследования показали, что морфология митохондрий тесно связана с их функциональной активностью. Вместе с тем, было обнаружено, что белки, участвующие в процессе митохондриальной динамики, могут модулировать и другие функции митохондрий. В нашей работе, проведенной на нейтрофилах человека, было показано, что динамин-подобный белок 1 (DRP1), ответственный за фрагментацию митохондрий, участвует в НЕТозе, реализуя свою классическую функцию. В то же время, подавление окислительного взрыва при ингибировании DRP1 было вероятно обусловлено его неклассической функцией, связанной с работой митохондриальной поры.

Ключевые слова: нейтрофилы, нейтрофильные внеклеточные ловушки, НЕТоз, окислительный взрыв, NADPH-оксидаза, фрагментация митохондрий

DOI: 10.31857/S102872210006720-7

Адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12. МГУ имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет.

Воробьева Нина Викторовна. Тел. +7 916 820 88 37 (моб.).

E-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Авторы:

Воробьева Н. В., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия;

Кулаков В. В., д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы осуществляют защиту организма от патогенов, используя такие эффекторные функции как фагоцитоз, дегрануляцию и образование активных форм кислорода (АФК). Было также показано [1], что нейтрофилы обладают еще одним уникальным свойством – способностью выбрасывать наружу деконденсированные фибриллы ДНК, которые в очаге воспаления играют роль ловушек для патогенов, ограничивая их распространение по организму. У нейтрофилов такие образования были названы нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET или

NETs, от Neutrophil Extracellular Traps), а процесс их образования, ведущий к гибели нейтрофилов – НЕТозом (NETosis).

Несмотря на то, что функциональная роль НЕТоза является общепризнанной, механизмы образования ловушек до конца не изучены. НЕТоз был в значительной степени исследован в системе *in vitro* при стимуляции нейтрофилов активатором протеинкиназы C, ФМА. Было показано, что в сигнальном каскаде активации NET участвуют такие белки гранул, как нейтрофильная эластаза и миелопероксидаза, а также пептидил-аргинин дезаминаза 4 типа. Так же, известно, что для осуществления НЕТоза нужны активные формы кислорода (АФК), которые, как правило, образуются в процессе окислительного взрыва при участии ферментного комплекса NADPH-оксидазы.

В настоящее время накоплено немало фактов, говорящих, что помимо NADPH-оксидазы в НЕТозе могут также принимать участие митохондрии и, соответственно, митохондриальные АФК (мТАФК) [2]. Так, ранее мы показали, что в НЕТозе, активированном кальциевыми ионо-

форами и хемоаттрактантом fMLP, принимает участие митохондриальная пора (mPTP), многокомпонентный канал, расположенный во внутренней мембране митохондрий и вовлеченный в регуляцию клеточной смерти и выбросе Ca^{+2} и мтАФК из матрикса. Известно, что митохондрии способны образовывать динамические тубулярные сети, непрерывно изменяющие свою форму благодаря процессам слияния и фрагментации (процесс митохондриальной динамики). Было показано, что белки, участвующие в этом процессе, обладают также способностью модулировать многие функции митохондрий, например, митохондриальное дыхание, используя при этом механизмы, не относящиеся прямо к изменению морфологии. Так, в своей недавней работе, проведенной на кардиомиоцитах крыс, Цанг и соавт. [3] показали, что DRP1, известный регулятор фрагментации митохондрий, усиливает митохондриальное дыхание опосредованно, через mPTP.

Мы предположили, что НЕТоз и окислительный взрыв нейтрофилов человека, тесно связанные с функциональной активностью митохондрий, могут зависеть не только от их морфологии, но и от белков, регулирующих процесс митохондриальной динамики, например, от DRP1.

МЕТОДЫ

Выделение нейтрофилов

Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров или больных хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) методом центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Фикола (1.077 г/см^3) как описано ранее [4].

Оценка окислительного взрыва

Для оценки суммарных (внутри- и внеклеточных) АФК использовали метод регистрации люминол-зависимой хемилюминесценции [5].

Индукция и флуоресцентное окрашивание нейтрофильных ловушек

Нейтрофильные ловушки индуцировали ФМА или А23187 в клетках, адгезированных на покровных стеклах, в течение 2 ч 40 мин и 4 ч, соответственно, как описано ранее [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки участия процесса митохондриальной динамики в НЕТозе и окислительном

взрыве нейтрофилов человека, нами была выбрана хорошо известная ГТФаза, DRP1, ответственная за фрагментацию митохондрий. В работе был применен ингибиторный анализ, в частности, был использован ингибитор DRP1, Mdivi-1. Для оценки участия DRP1 в окислительном взрыве, Mdivi-1 титровали в широком диапазоне концентраций (1–25 мкМ) и далее стимулировали окислительный взрыв индукторами с разными механизмами действия (ФМА, fMLP и А23187). Так, окислительный взрыв под действием ионофора А23187 и fMLP, в отличие от ФМА, напрямую зависел от митохондрий. Было показано дозозависимое подавление окислительного взрыва, индуцированного А23187 и fMLP, но не ФМА, при возрастании концентрации Mdivi-1. Прединкубация нейтрофилов здоровых доноров с Mdivi-1 в течение 30 мин и последующая активация НЕТоза с помощью ФМА и А23187 также показала дозозависимое подавление образования ловушек. Участие белка DRP1 в НЕТозе было подтверждено на нейтрофилах, выделенных из крови больных X-сцепленной ХГБ. Нейтрофилы таких пациентов имели абсолютно неактивную NADPH-оксидазу, что определяли по отсутствию у них окислительного взрыва и ФМА-зависимого НЕТоза. Однако, как было нами показано ранее, нейтрофилы ХГБ образовывали ловушки в ответ на кальциевые ионофоры, что было обусловлено мтАФК. В серии опытов на нейтрофилах ХГБ мы показали, что НЕТоз таких нейтрофилов, индуцированный кальциевыми ионофорами, был подавлен дозозависимым способом при действии возрастающих доз Mdivi-1. Тем самым, было подтверждено, что Mdivi-1 действовал на свою единственную мишень, DRP1, а не на NADPH-оксидазу.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе впервые было показано участие белка DRP1, ответственного за фрагментацию митохондрий, в окислительном взрыве и НЕТозе нейтрофилов человека. Подавление НЕТоза ингибитором DRP1 при его стимуляции ФМА и А23187, то есть, разными по своему механизму действия веществами, говорит о вовлечении в этот процесс классической функции этого белка. Можно предполагать, что митохондриальная динамика, сдвинутая в сторону слияния митохондрий, тормозит процесс образования ловушек, что, возможно, связано с подавлением тубулинового или актинового аппаратов клетки. Вместе с тем, окислительный взрыв нейтрофи-

лов подавлялся в зависимости от того, каким стимулом мы его индуцировали, зависимым (A23187, fMLP) или не зависимым (ФМА) от митохондрий. Такая зависимость окислительного взрыва от типа стимула, вероятнее всего, тоже связана с участием DRP1, однако, действующего в этом случае через митохондриальную пору mPTP, как это было показано для кардиомиоцитов крыс [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 2004, 303, 1532–1535.
2. Douda D. N., Khan M. A., Grasemann H., Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, 112, 2817–2822.
3. Zhang H., Wang P., Bisetto S., Yoon Y., Chen Q., Sheu S. S., Wang W. A novel fission-independent role of dynamin-related protein 1 in cardiac mitochondrial respiration. *Cardiovasc. Res.* 2017, 113, 160–170.
4. Vorobjeva N., Prikhodko A., Galkin I., Pletjushkina O., Zinovkin R., Sud'ina G., Chernyak B., Pinegin B. Mitochondrial reactive oxygen species are involved in chemoattractant-induced oxidative burst and degranulation of human neutrophils *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* 2017, 96, 254–265.
5. Vorobjeva N. V., Pinegin B. V. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. *Immunobiology*, 2016, 221, 208–219.

THE ROLE OF DRP1 PROTEIN, RESPONSIBLE FOR MITOCHONDRIAL FRAGMENTATION, IN THE OXIDATIVE BURST AND NETOSIS OF HUMAN NEUTROPHILS

© 2019 N. V. Vorobjeva^{1*}, V. V. Kulakov²

*E-mail: nvvorobjeva@mail.ru

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia;

²Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 02.04.2019

Neutrophil mitochondria are in a state of dynamic equilibrium, which is supported by two opposite processes: fusion and fission. Numerous studies have shown that the morphology of mitochondria is closely related to their functional activity. However, it was found that proteins involved in the process of mitochondrial dynamics can modulate other functions of mitochondria too. As was shown in our work on the model of human neutrophils, the dynamin-related protein 1 (DRP1) responsible for mitochondrial fission, is involved in NETosis, realizing its classic function. At the same time, the suppression of the oxidative burst via the DRP1 was due to its non-classical function associated with its action on the mitochondrial pore.

Key words: neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETosis, oxidative burst, mitochondrial permeability transition pore, mPTP, fragmentation of mitochondria

Authors:

Vorobjeva N. V., ☒ Ph.D., Senior Research Associate, Lomonosov Moscow State University, Russia, Moscow.

E-mail: nvvorobjeva@mail.ru;

Kulakov V. V., Doctor of Medical Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Clinical Immunology, Institute of Immunology, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia.