

УДК 616-092

Динамика эктопических стрессорных гранул в клетках FRSN и EA.hy926

Пасько А.Ю.¹, Микрюкова А.А.¹, Зайченко Д.М.¹, Московцев А.А.^{1,2}, Кубатиев А.А.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Федеральное Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

123995, Москва, ул. Баррикадная, д. 2/1

Стрессорные гранулы (СГ) – цитоплазматические рибонуклеопротеиновые ассоциаты, формирующиеся при остановке кап-зависимой трансляции в эукариотических клетках под действием стрессорных факторов, таких, как повышенная температура, гипоксия, ультрафиолет и др. СГ могут также спонтанно собираться при повышении экспрессии их белковых компонентов. В данной работе были экспрессированы в клетках FRSN и EA.hy926 компоненты СГ – белки TIA1 и G3BP1, в виде слитых с флуоресцентным EGFP белком гранул, что позволило визуализировать динамику СГ. Нами обнаружена спонтанная сборка и стабильная персистенция СГ после трансфекции. Однако частота диссоциации СГ возрастала с увеличением времени от трансфекции. При стрессе ЭПР, индуцированном дитиотреитолом, число клеток с СГ возрастало, однако, как правило, это была поздняя нуклеация СГ, что мы предполагаем связанным с присоединившимися вторичными стрессовыми факторами на фоне стресса ЭПР. С учетом важной роли СГ в выживании клеток мониторинг СГ дает дополнительную информацию о механизмах клеточного стрессового ответа в культурах клеток FRSN и EA.hy926.

Ключевые слова: клеточный стресс; стрессорные гранулы; TIA1; G3BP1; эндотелиальные клетки; EA.hy926; FRSN.

Для цитирования: Пасько А.Ю., Микрюкова А.А., Зайченко Д.М., Московцев А.А., Кубатиев А.А. Динамика эктопических стрессорных гранул в клетках FRSN и EA.hy926. *Патогенез*. 2022; 20(4): 87-92

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.04.87-92

Для корреспонденции: Пасько Алексей Юрьевич, alexihox@gmail.com

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00820 "Короткие РНК и РНК-деградом при стрессе эндоплазматического ретикулума и стресс-индуцированном клеточном старении"; <https://rscf.ru/project/22-25-00820/>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.10.2022

Dynamics of ectopic stress granules in FRSN and EA.hy926 cells

Pasko A.Yu.¹, Mikryukova A.A.¹, Zaychenko D.M.¹, Moskovtsev A.A.^{1,2}, Kubatiev A.A.^{1,2}

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology,
Baltijskaya St. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Continuing Vocational Education,
Barrikadnaya St. 2/1, Moscow 123995, Russian Federation

Stress granules (SGs) are cytoplasmic ribonucleoprotein associates that are formed when the cap-dependent translation is attenuated in eukaryotic cells during cellular stress caused by elevated temperature, hypoxia, ultraviolet light, etc. SGs can also spontaneously assemble upon overexpression of their protein components. In this work, the SG components, TIA1 and G3BP1 proteins, were expressed in FRSN and EA.hy926 cells as a fusion protein with fluorescent EGFP, which enabled visualization of artificial SGs. We found spontaneous assembly and stable persistence of SG following the transfection. However, the frequency of SG dissociation increased with increasing time after the transfection. Under the ER stress induced by dithiothreitol, the number of cells with SGs increased. However, that was a generally late nucleation of SGs. This we assumed was related to secondary stress factors that had joined during oER stress. Given the important role of SGs in cell survival, monitoring of SGs provides additional information on the mechanisms of cellular stress response in FRSN and EA.hy926 cells.

Keywords: cellular stress; stress granules; TIA1; G3BP1; endothelial cells; EA.hy926; FRSN.

For citation: Pasko A.Yu., Mikryukova A.A., Zaychenko D.M., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. [Dynamics of ectopic stress granules in FRSN and EA.hy926 cells]. *Patogenez [Pathogenesis]*. 2022; 2022; 20(4): 87-92

DOI: 10.25557/2310-0435.2022.04.87-92

For correspondence: Pasko Alexey Yurievich, alexihox@gmail.com

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, Project #22-25-00820, <https://rscf.ru/project/22-25-00820/>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: 30.10.2022

Введение

Стрессорные гранулы (СГ) – временные безмембранные органеллы, формирующиеся в цитозоле эукариотических клеток при действии стрессорных факторов, таких, как повышенная температура, гипоксия, ультрафиолет и др. [1]. В таких нефизиологических условиях может произойти временная остановка кэп-зависимой трансляции, обусловленная фосфорилированием фактора инициации трансляции eIF2a и ингибированием сборки 48S преинициаторного комплекса [2]. В результате этого полисомы диссоциируют, и не-транслируемая РНК, а также основные компоненты преинициаторного комплекса собираются совместно с другими белками и РНК в рибонуклеопротеиновые комплексы – стрессорные гранулы [3, 4].

Состав СГ варьирует в различных условиях и высокочинамичен [5]. Несмотря на активные исследования, эти комплексные структуры в различных клеточных типах изучены недостаточно. В нашей работе мы исследовали персистенцию стрессорных гранул, индуцируемых повышенной экспрессией белков TIA1 и G3BP1 в базовых условиях и при стрессе эндоплазматического ретикула (ЭПР) в нормальных фибробластоподобных клетках FRSN и эндотелиоцитоподобной линии EA.hy926.

Материалы и методы исследования

Клеточные культуры, индукция стресса ЭПР. В работе использовались гибридная эндотелиоцитоподобная клеточная линия EA.hy926, а также культура фибробластоподобных клеток FRSN любезно предоставленная Dr. C.J. Edgel (University of North Carolina, USA). Линия была получена путем слияния первичной эндотелиальной клеточной линии HUVEC с клеточной линией аденокарциномы легкого A-549. Для культивирования клеток использовали среду DMEM (Gibco, США) с добавлением 4,5 г/л глюкозы, 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамин, 1% NEAA. Рост клеток проходил в инкубаторе («Sanyo», Япония) при 37°C в 5% CO₂/95% воздушной атмосфере. Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в 3–4 суток по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию монослоя 3-минутной экспозицией в растворе трипсина-ЭДТА (0,05%) (ПанЭко, Россия). В экспериментах использовали клетки 3–13-го пассажей. Пассирование клеток осуществляли по достижению культурой 90% конfluence.

Была использована также первичная культура фибробластоподобных клеток FRSN из крайней плоти ребенка 3 лет, полученная из Российской коллекции культур клеток позвоночных, Институт цитологии РАН (Exp. Dermatol. 2008. 17: 925-932; Цитология, 2012.54 (1): 5–16). Данные клетки имеют фибробластоподобную морфологию, экспрессируют поверхностные антигены, характерные для мезенхимных стволовых кле-

ток: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC. Наблюдается отсутствие экспрессии CD34 и HLA-DR. Клетки имеют нормальный кариотип человека (46, XY), количество полиплоидов составляет 13%, модальное число хромосом 46 (98,5±1,2%).

Для культивирования клеток использовали ростовую среду DMEM с глюкозой (4,5 г/л) с добавлением 10% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л глутамина. Культивирование проходило при 37°C, в атмосфере с 5% содержанием CO₂.

Для индукции стресса ЭПР добавляли дитиотреитол в конечной концентрации 2,5 мМ в ростовую среду или FluoroBrite.

Трансфекция. Для трансфекции клетки предварительно высевали в 96-луночный планшет и при конfluence 50–80% проводили смену среды на свежую с добавлением Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) с предварительно сформированными в ней липopleксами за счет взаимодействия плазмидных ДНК pEGFP-C1-G3BP1-WT (Addgene #135997), pFRT_TO_eGFP_TIA1 (Addgene #106094) с трансфецирующим агентом согласно инструкции производителя. В качестве системы для трансфекции использовались смеси нейтральных и катионных липидов. Вектора наращивали в штаммах и очищали с помощью наборов Qiagen.

Флуоресцентная прижизненная микроскопия. Визуализацию клеток начинали через 24 часа после трансфекции и проводили в течение 24 часов. Использовали моторизованный флуоресцентный микроскоп Nikon Ti2, высокочувствительную камеру Iris и программное обеспечение NIS Elements. Для сегментации гранул использовали программу Ilastik, использующую для работы нейронную сеть. Обучение проводилось с использованием всех доступных параметров.

Результаты исследования и обсуждение

Прижизненное наблюдение за TIA1-EGFP-содержащими стрессорными гранулами. Нами были проведены трансфекции клеток FRSN и EA.hy926 плазмидами pEGFP-C1-G3BP1-WT (Addgene #135997), pFRT_TO_eGFP_TIA1 (Addgene #106094). В этих генетических конструкциях гены G3BP1 и TIA1, слитые с зелёным флуоресцентным белком, находятся под контролем цитомегаловирусного промотера, что должно обеспечить сравнительно высокий уровень экспрессии в трансфецированных клетках. В наших экспериментах эффективность трансфекции клеток EA.hy926 была заметно выше FRSN. При этом уровень экспрессии слитых белков в клетках различался – наблюдались клетки с низкой и высокой флуоресценцией.

В клетках FRSN белок TIA1-EGFP после трансфекции имел преимущественно ядерную локализацию с ядерными гранулами и со слабой диффузной флуоресценцией цитоплазмы (рис. 1, А). В части клеток TIA1-EGFP-содержащие гранулы уже детектировались

на момент начала наблюдения, как, например, показано на **рис. 1**, происходила также их спонтанная разборка (**рис. 1, А**, 8 часов). Кроме того, в единичных клетках обнаруживали и их спонтанное образование. Число гранул практически не менялось в большинстве клеток на протяжении наблюдения, за исключением случаев спонтанной разборки СГ (**рис. 1, Б**). В клетках FRSN после трансфекции размер СГ плавно увеличивался, разборка СГ представляла собой сравнительно быстротекущий процесс (**рис. 1, В**).

В клетках EA.hu926 спустя 24 ч после трансфекции TIA1-EGFP имел похожий характер распределения с флуоресцентными гранулами на фоне диффузной флуоресценции цитоплазмы (**рис. 2**). Число гранул существенно не менялось в большинстве клеток на всем протяжении наблюдения (2,5 суток), но чаще к концу срока наблюдения происходила спонтанная разборка гранул.

Клетки FRSN, экспрессирующие TIA1-EGFP, были подвергнуты воздействию 2,5 мМ дитиотрейтола, вызывающего стресс ЭПР [6]. В начале воздействия в части

клеток FRSN обнаруживались только TIA1-EGFP-содержащие гранулы ядерной локализации, при этом интенсивность флуоресценции ядра заметно выше цитоплазмы, и спустя ~10–14 часов после воздействия в таких клетках начиналась нуклеация TIA1-EGFP гранул. Такие клетки иногда подвергались апоптозу, при этом крупные и до этого относительно неподвижные ядерные гранулы TIA1-EGFP стягивались в область ядра, что, по-видимому, может быть связано с формированием апоптотических телец.

Часть популяции FRSN экспрессировала TIA1-EGFP слабее и представляла собой более мелкие клетки, при этом в условиях без добавления индуктора стресса в их цитоплазме наблюдались единичные фокусы флуоресценции на протяжении от нескольких часов до суток.

Прижизненное наблюдение за G3BP1-EGFP-содержащими стрессорными гранулами. Клетки FRSN и EA.hu926, экспрессирующие G3BP1-EGFP, были также подвергнуты воздействию 2,5 мМ дитиотрейтола. В стрессированных фибробластах в 2 раза чаще обнару-

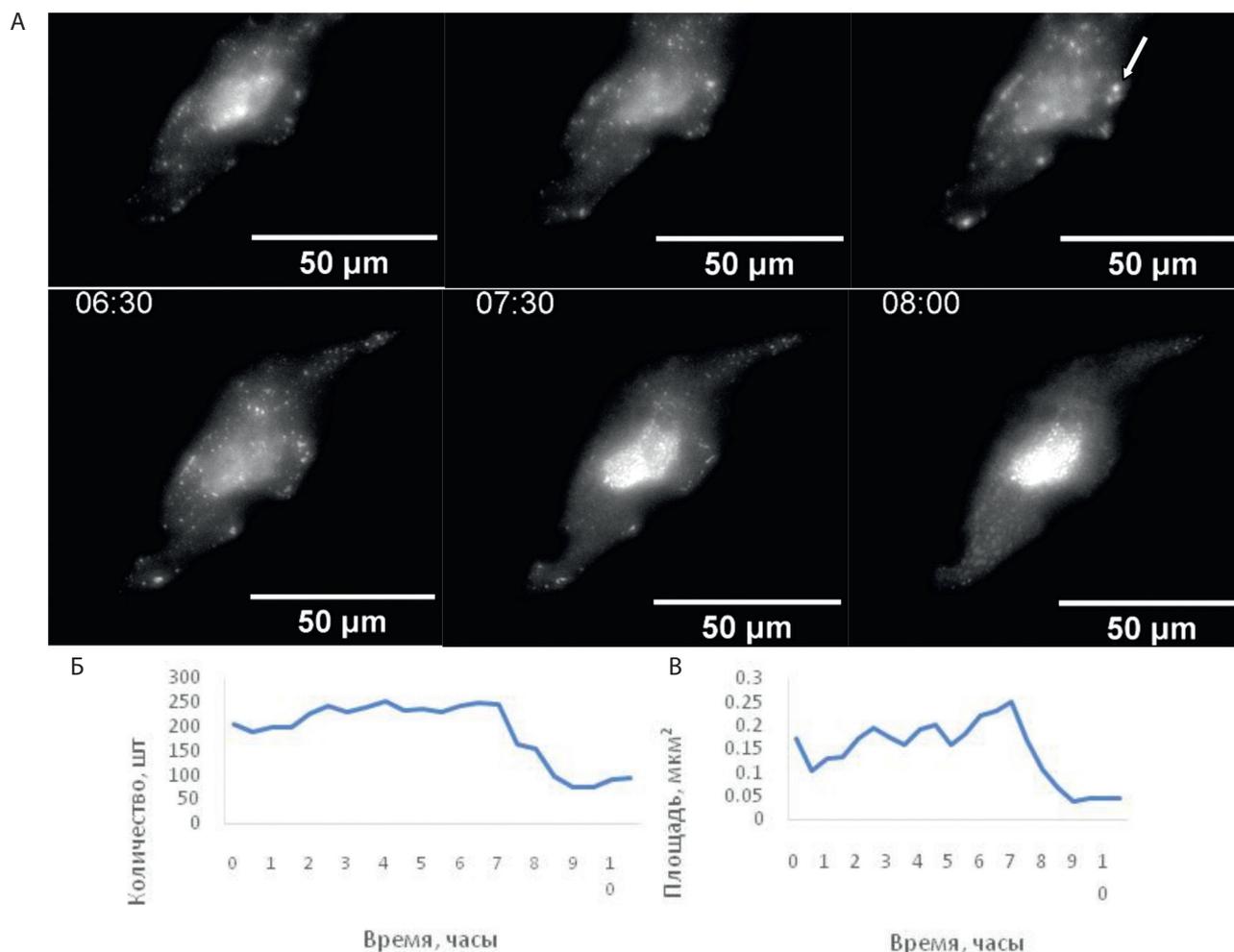


Рис. 1. Динамика TIA1-EGFP-содержащих стрессорных гранул в клетках FRSN в базовых условиях: А – серия микрофотографий в течение 8-часового интервала, стрелкой помечены СГ; Б – график зависимости числа СГ от времени наблюдения; В – график зависимости средней площади СГ от времени наблюдения.

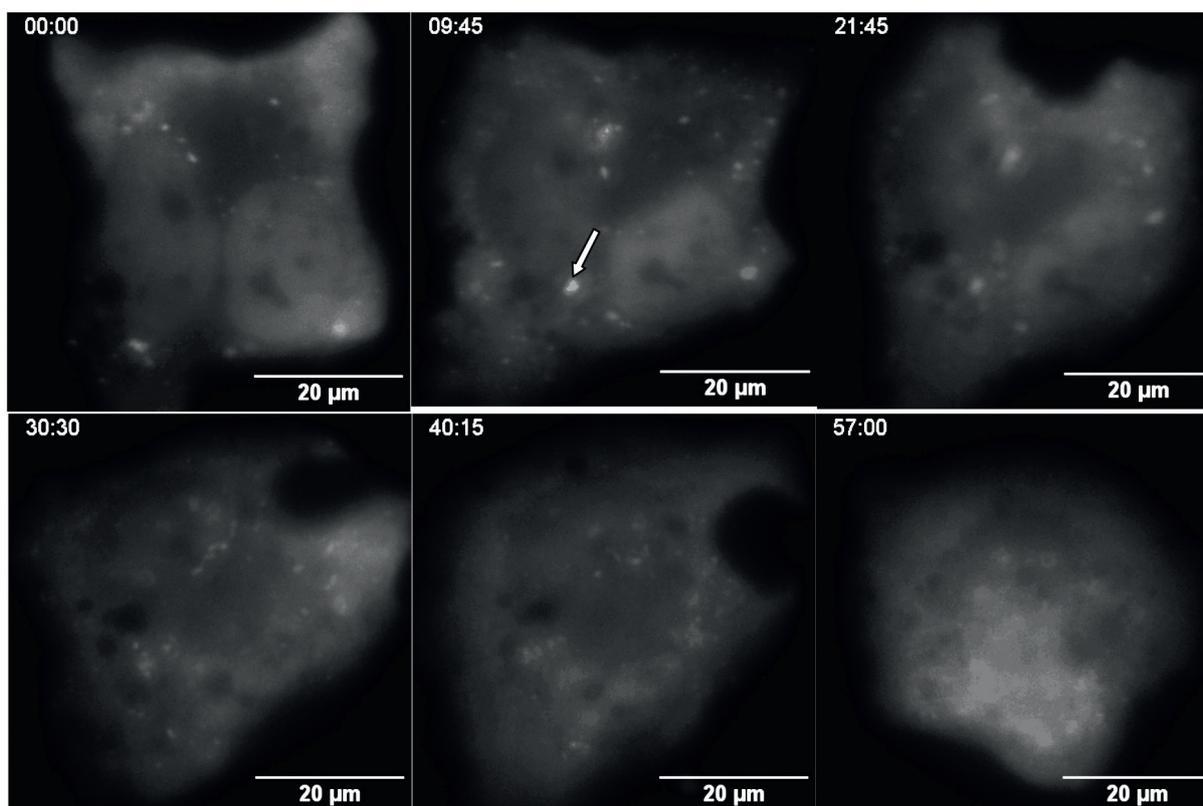


Рис. 2. Динамика TIA1-EGFP-содержащих стрессорных гранул в клетках EA.hy926 в базовых условиях: серия микрофотографий в течение 57 часов, стрелкой помечены СГ.

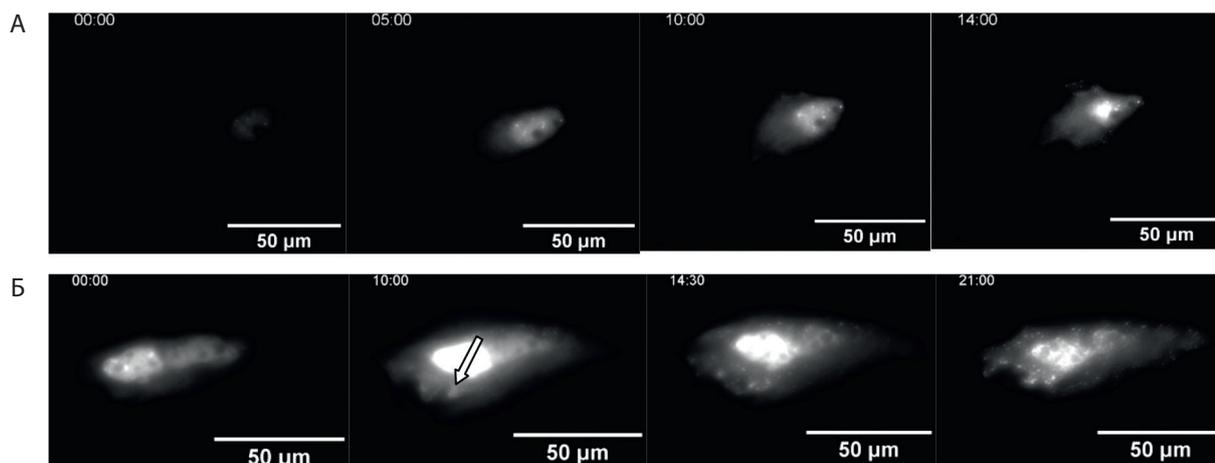


Рис. 3. Динамика TIA1-EGFP-содержащих стрессорных гранул в клетках FRSN, серия микрофотографий: А – контроль; Б – стресс ЭПР. Стрелкой помечено начало нуклеации TIA1-EGFP гранулы.

живались G3BP1-EGFP гранулы. В клетках EA.hy926 также отмечалась сборка СГ в различных временных точках от начала стресса, в ряде случаев была детектирована диссоциация СГ. Например, на **рис. 4** показан процесс сборки СГ на 25-й час от начала стресса, их персистенции (около суток) и диссоциации.

СГ имеют тенденцию к быстрой сборке в клетках – фосфорилирование фактора инициации трансляции eIF2a может происходить в течение нескольких минут от начала действия индуктора стресса, например арсе-

нита. Наблюдаемая поздняя сборка СГ может быть вызвана действием новых или персистирующих стрессорных факторов – стресс ЭПР может повлечь за собой дополнительные отсроченные по времени «стрессы», например, окислительный стресс [7, 8], повреждение ДНК и др., что может вызвать блок трансляции. Диссоциация стрессорных гранул может быть связана с нестабильностью дитиотрептола в ростовой среде – его окислением, в результате чего интенсивность стрессового воздействия с течением времени падает.

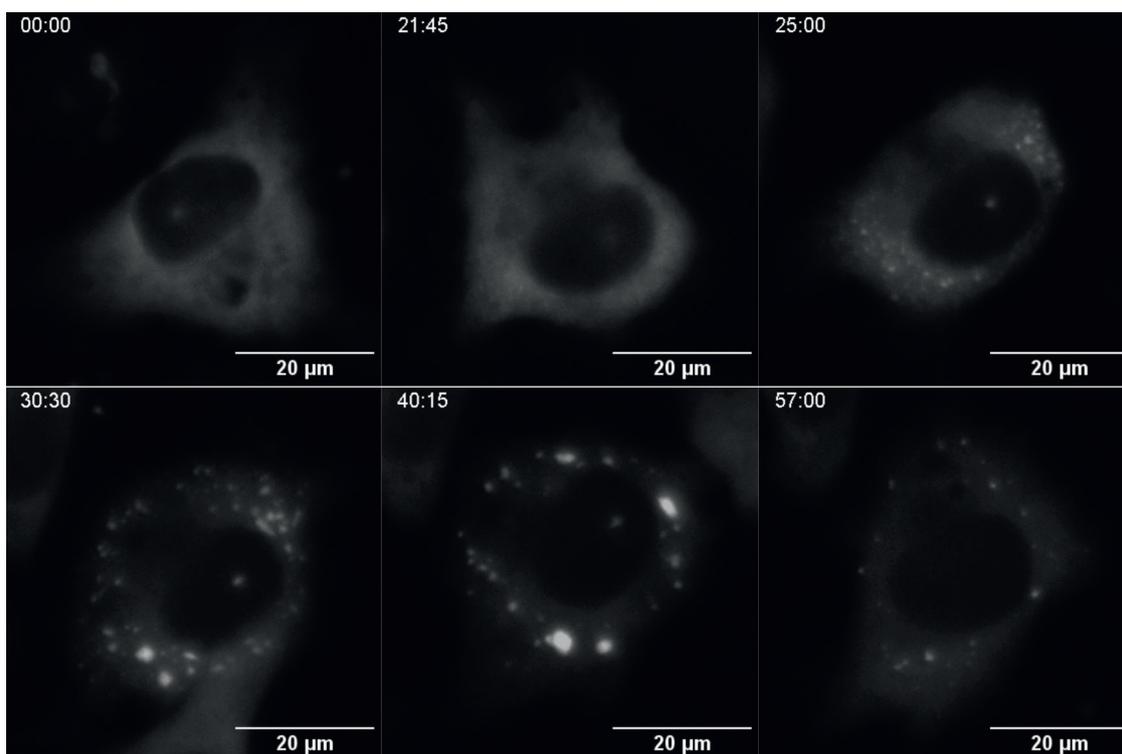


Рис. 4. Динамика G3BP1-EGFP-содержащих стрессорных гранул в клетках EA.hy926 при стрессе ЭПР.

Повышенная экспрессия белков, ассоциированных со СГ, таких, как G3BP, TIA-1/TIAR индуцирует спонтанную сборку СГ в отсутствие дополнительного стресса [1]. Кроме того, при трансфекции может активироваться киназа PKR, которая вызывает фосфорилирование eIF2 α и спонтанную сборку СГ [4]. Было отмечено, что если TIA-1 экспрессируется в виде слитого белка с плазмид на основе pCDNA3 (Invitrogen) или pEGFP (Clontech) векторов, то такой белок с EGFP-тегом имеет преимущественно цитоплазматическую локализацию и подвергается спонтанной нуклеации в «искусственные», или эктопические СГ [1]. Считается, что по составу такие СГ идентичны нормальным СГ. Тем не менее, нами преимущественно детектировалась ядерная локализация TIA1-EGFP. И в части популяции FRSN, и в части популяции EA.hy926 (в меньшей степени) мы определяли спонтанно собранные G3BP1-EGFP и TIA1-EGFP гранулы, причем G3BP1-EGFP-гранулы имели сравнительно большие размеры.

Заключение

Таким образом, в клетках FRSN и EA.hy926 при гиперэкспрессии TIA1 и G3BP1 нами обнаружена спонтанная сборка и стабильная персистенция СГ. Однако, частота диссоциации СГ возрастала с увеличением времени от инкубации, что может свидетельствовать предположительно о снижении сигнальной активности ки-

назы PKR. При стрессе ЭПР, индуцированном дитиотреитолом, число клеток с СГ возрастало, однако, как правило, это была поздняя нуклеация СГ, что мы связываем с присоединившимися вторичными стрессовыми факторами при действии дитиотреитола.

Список литературы

1. Kedersha N, Anderson P. Mammalian Stress Granules and Processing Bodies. *Methods Enzymol.* 2007; 431: 61–81. DOI: 10.1016/S0076-6879(07)31005-7
2. Srivastava S.P., Kumar K.U., Kaufman R.J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2416–2423. DOI: 10.1074/JBC.273.4.2416
3. Kedersha N., Chen S., Gilks N., Li W., Miller I.J., Stahl J., Anderson P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell.* 2002; 13: 195–210. DOI: 10.1091/MBC.01-05-0221
4. Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell. Biol.* 1999; 147: 1431–1441. DOI: 10.1083/JCB.147.7.1431
5. Wheeler J.R., Matheny T., Jain S., Abrisch R., Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife.* 2016; 5. DOI: 10.7554/ELIFE.18413
6. Mesitov M.V., Soldatov R.A., Zaichenko D.M., Malakho S.G., Klementyeva T.S., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A., Mironov A.A., Moskovtsev A.A. Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1–14. DOI: 10.1038/srep46080
7. Malhotra J.D., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 2007; 9: 2277–2293. DOI: 10.1089/ARS.2007.1782
8. Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мещерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А., Кубатиев А.А.

Индукция стресса эндоплазматического ретикулума в условиях окислительно-восстановительного дисбаланса в клетках Т-лимфоцитарной лейкемии человека. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2012; 56(3): 87–93.

Reference

1. Kedersha N, Anderson P. Mammalian Stress Granules and Processing Bodies. *Methods Enzymol.* 2007; 431: 61–81. DOI: 10.1016/S0076-6879(07)31005-7
2. Srivastava S.P., Kumar K.U., Kaufman R.J. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 2416–2423. DOI: 10.1074/JBC.273.4.2416
3. Kedersha N., Chen S., Gilks N., Li W., Miller I.J., Stahl J., Anderson P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol. Biol. Cell.* 2002; 13: 195–210. DOI: 10.1091/MBC.01-05-0221
4. Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell. Biol.* 1999; 147: 1431–1441. DOI: 10.1083/JCB.147.7.1431
5. Wheeler J.R., Matheny T., Jain S., Abrisch R., Parker R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife.* 2016; 5. DOI: 10.7554/ELIFE.18413
6. Mesitov M.V., Soldatov R.A., Zaichenko D.M., Malakho S.G., Klementyeva T.S., Sokolovskaya A.A., Kubatiev A.A., Mironov A.A., Moskovtsev A.A. Differential processing of small RNAs during endoplasmic reticulum stress. *Sci. Rep.* 2017; 7: 1–14. DOI: 10.1038/srep46080
7. Malhotra J.D., Kaufman R.J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* 2007; 9: 2277–2293. DOI: 10.1089/ARS.2007.1782
8. Mesitov M.V., Ignashkova T.I., Meshchersky M.E., Akopov A.S., Sokolovskaya A.A., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. [Induction of the endoplasmic reticulum stress in conditions of acid-base imbalance in human cells of T-lymphoblastic leukemia]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya [Pathological Physiology and Experimental Therapy]*. 2012; 56(3): 87–93. (in Russian)

Сведения об авторах:

Пасько Алексей Юрьевич — младший научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Микрюкова Анна Алексеевна — младший научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Зайченко Данила Михайлович — научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Московцев Алексей Александрович — кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции агрегатного состояния крови Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; доцент кафедры общей патологии и патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кубатиев Аслан Амирханович — доктор медицинских наук, академик РАН, научный руководитель Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; заведующий кафедрой общей патологии и патофизиологии Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации; <https://orcid.org/0000-0001-8077-2905>