

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 571.27

Роль изоформ протеинкиназы С в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек

Н.В. Воробьева^{1, *} , С.С. Вахлярская², Б.В. Черняк³

¹Кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Отделение клинической иммунологии и ревматологии, Российская детская клиническая больница, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Россия, 119571, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Нейтрофилы высвобождают деконденсированный ядерный хроматин, или нейтрофильные внеклеточные ловушки (NET, от Neutrophil Extracellular Trap) в ответ на большое количество разнообразных физиологических и фармакологических стимулов. Однако, кроме защиты хозяина от инфекции, NET играют важную роль в патогенезе различных аутоиммунных, воспалительных и злокачественных заболеваний. В этой связи понимание молекулярных механизмов образования NET, ведущее, как правило, к гибели нейтрофилов (NETоз), крайне важно для обеспечения контроля последствий aberrантного или избыточного выброса хроматина. Протеинкиназа С (PKC, protein kinase C) представляет собой серин/треониновую киназу, которая участвует в разнообразных функциях нейтрофилов, однако ее участие в NETозе изучено недостаточно. Поскольку у нейтрофилов человека описано пять изоформ PKC (α , β I, β II, δ и ζ), в нашей работе был изучен их вклад в NETоз и окислительный взрыв с использованием ингибиторного анализа. Используя специфические ингибиторы изоформ PKC, мы показали, что PKC β , PKC δ и PKC ζ участвуют в окислительном взрыве и NETозе, индуцированном кальциевым ионофором A23187, тогда как PKC β участвует в окислительном взрыве и NETозе при активации клеток миметиком диацилглицерола форбол-12-миристан-13-ацетатом.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, нейтрофильные внеклеточные ловушки, NETоз, окислительный взрыв, изоформы протеинкиназы С

Нейтрофилы являются наиболее многочисленными лейкоцитами крови и первой линией защиты хозяина от патогенов. Являясь профессиональными фагоцитами, нейтрофилы содержат антимикробные ферменты в гранулах и отвечают в очагах воспаления за такие эффекторные функции, как фагоцитоз и дегрануляция, а также вызывают окислительный взрыв, который состоит в интенсивном образовании активных форм кислорода (АФК) при активации ферментного комплекса НАДФН-оксидазы. Новой эффекторной функцией нейтрофилов, впервые обнаруженной Такей и соавт. [1] и всесторонне исследованной в лаборатории Циклинского [2], является образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET, от Neutrophil Extracellular Trap). NET состоят из деконденсированного хроматина, покрытого гистонами, антимикробными ферментами и катионными пептидами гранул, а также цитозольными белками [2, 3]. Процесс образования NET, веду-

щий к программируемой гибели клеток, был назван NETозом [4].

Впоследствии стало ясно, что, помимо защитной функции, NET играют существенную роль в патогенезе большого количества аутоиммунных, воспалительных и онкологических заболеваний [5–8]. В связи с этим понимание молекулярных механизмов NETоза важно для обеспечения контроля последствий нерегулируемого или избыточного образования NET.

Классический NETоз представляет собой многостадийный процесс, включающий активацию, образование АФК НАДФН-оксидазой, диссоциацию под действием пероксида водорода «азуром», белковых комплексов, расположенных в мембранах азуромных гранул [9], выход из азуром сериновых протеаз (нейтрофильной эластазы – НЭ, катепсина G и азуроцидина) и миелопероксидазы (МПО) в цитоплазму, миграцию НЭ и МПО в ядро, где вместе с пептидил-аргининде-

заминазой 4 (PAD4, peptidylarginine deiminase-4), цитруллинирующей гистоны, они способствуют деконденсации ядерного хроматина [2].

Образование NET может быть индуцировано большим количеством разнообразных физиологических стимулов, таких как бактерии, грибы, простейшие, вирусы и продукты клеточной стенки бактерий (липополисахариды). NETоз также могут индуцировать антитела [10], цитокины (IL-8, IL-1 β , TNF- α) [3, 11], микрокристаллы [12], кальциевые и калиевые [13] ионофоры, а также фармакологические стимулы – например, фтороболовые эфиры.

Большинство этих стимулов активирует NETоз, зависящий от АФК, генерируемых многокомпонентным ферментным комплексом НАДФН-оксидазой. НАДФН-оксидаза активируется после сборки четырех цитозольных субъединиц (p47phox, p67phox, p40phox и Rac2) с трансмембранными субъединицами (gp91phox и p22phox), и его работа тонко регулируется фосфорилированием протеинкиназой С [14].

В соответствии с общепринятой моделью активация РКС происходит после ее транслокации из цитозоля в мембрану. После активации РКС фосфорилирует остатки серина и треонина на субъединицах НАДФН-оксидазы. Семейство РКС млекопитающих включает 12 изоформ, разделенных на три подсемейства в соответствии с их доменной структурой и регуляцией [15]. Классические изоформы РКС (сРКС) включают РКСа, РКС β I, РКС β II и РКС γ и активируются при связывании с фосфатидилсеринем, диацилглицеролом (ДАГ) и Ca²⁺, а также с миметиком ДАГ, ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат). Новые изоформы РКС (нРКС) включают РКС δ , РКС ϵ , РКС η и РКС θ . Эти киназы нечувствительны к кальцию и активируются ДАГ и ФМА. Атипичные РКС (аРКС) представлены изоформами РКС ζ и РКС τ / λ , они нечувствительны к кальцию и не отвечают на ФМА и ДАГ, однако активируются фосфоинозитид-зависимой протеинкиназой-1, фосфатидилинозитол-3-киназой и ее продуктом фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатом. Как было показано в многочисленных исследованиях, нейтрофилы человека содержат пять изоформ РКС (α , β I, β II, δ и ζ) [16, 17].

Ранее было установлено, что изоформы РКС участвуют в различных функциях нейтрофилов, таких как окислительный взрыв, адгезия, дегрануляция, фагоцитоз и апоптоз [18]. Однако мало что известно о том, какие изоформы РКС участвуют в NETозе, активируемом различными физиологическими и фармакологическими стимулами. В нашем исследовании было всесторонне изучено влияние классических, новых и атипичных изоформ РКС на NETоз нейтрофилов человека, активированных ионофором кальция A23187 и фтороболовым эфиром ФМА.

Материалы и методы

Реагенты. ФМА, A23187, хелеритрин (ингибитор всех изоформ РКС), ротлтерин (ингибитор РКС δ), LY333531 (ингибитор РКС β), миристолированный псевдосубстрат РКС ζ (ингибитор РКС ζ), верапамил, люминол были приобретены у Sigma-Aldrich (США). Краситель SYBR Green и смола ProLong Gold были закуплены в Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, США).

Выделение первичных нейтрофилов человека. Все исследования с кровью проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г. и были одобрены локальным комитетом по этике. Периферическую кровь здоровых доноров или пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ) забирали в утренние часы натощак в полипропиленовые пробирки с гепарином (20 МЕ \times мл⁻¹ крови). Нейтрофилы выделяли с помощью центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности Ficoll-Нугауе (плотность 1,077 г/см³) в течение 25 мин при 400g и комнатной температуре как описано ранее [19]. Основную массу эритроцитов удаляли путем седиментации в декстране. Оставшиеся эритроциты лизировали в гипотоническом растворе хлорида натрия (0,2% NaCl) в течение 30 с и далее восстанавливали физиологический солевой состав путем добавления гипертонического хлорида натрия (1,6% NaCl). Нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде (ПКС), включающей RPMI 1640 с добавлением 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин и 1% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Полученные клетки были представлены на 98% гранулоцитами, а их жизнеспособность составляла более 99%, что определяли по исключению 0,1% трипанового синего. Нейтрофилы инкубировали в течение 1 ч при 4 °С перед экспериментом.

Оценка люминолзависимой хемилюминесценции. Люминолзависимую хемилюминесценцию использовали для оценки суммарных АФК (внутри- и внеклеточных) как описано ранее [20].

Индукция и флуоресцентное окрашивание NET. Для обнаружения NET использовали флуоресцентную микроскопию. Для этого свежесделанные нейтрофилы (2×10^5 кл/мл) в ПКС с 1% ЭТС адгезировали на круглых покровных стеклах, находящихся в 24-луночном планшете в объеме 500 мкл, в течение 30 мин при 37 °С. Нейтрофилы инкубировали в лунках с одним из ингибиторов РКС в течение 30 мин при 37 °С и 5% CO₂. Образование NET индуцировали 30 нМ ФМА или 2 мкМ A23187 в течение 2 ч 40 мин и 4 ч соответственно. После стимуляции NETоза клетки фиксировали в лунках в 4%-ном растворе параформальдегида в течение 15 мин. Препараты погружали в SYBR Green, разведенный в PBS в соотношении 1:10000

в соответствии с рекомендацией производителя, и окрашивали в течение 7 мин при комнатной температуре в темноте. Подсчитывали общее количество клеток и количество нетотических клеток в каждом поле зрения, оценивали процент НЕТоза в нескольких полях зрения.

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), сопровождаемого тестом множественного сравнения Бонферрони для оценки различий между группами. Данные в тексте и на рисунках представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистически значимые значения p указаны на графиках: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Протеинкиназа С участвует в окислительном взрыве и НЕТозе, индуцированными различными стимулами. Чтобы выяснить, зависит ли НЕТоз нейтрофилов человека, активированный А23187 и ФМА, от РКС, был применен специфический ингибитор всех изоформ РКС, хелеритрин. Действие хелеритрина также оценивали на модели окислительного взрыва, индуцированного А23187 и ФМА, методом регистрации люминолзависимой хемилюминесценции.

На рис. 1 (А, Б) можно видеть, что инкубация нейтрофилов с хелеритрином в возрастающих концентрациях приводила к значительному и дозозависимому подавлению окислительного взрыва, индуцированного обоими стимулами. НЕТоз, стимулированный А23187 и ФМА, также дозозависимо подавлялся хелеритрином (рис. 1, В, Г и рис. Прилож.1А), что указывает на его зависимость от активации РКС при обоих способах стимуляции.

Мы предположили, что РКС, помимо субъединиц НАДФН-оксидазы (окислительный взрыв), может фосфорилировать некоторые другие субстраты, играющие важную роль в активации НЕТоза. Для проверки этого предположения мы использовали нейтрофилы, выделенные из крови больных ХГБ, имеющих мутации, полностью инактивирующие НАДФН-оксидазу. Такие нейтрофилы не способны генерировать оксидаза-зависимые АФК, а также не образуют NET в ответ на многие стимулы, включая ФМА (рис. Прилож.1Б), однако образуют NET в ответ на А23187 (2 мкМ). Инкубация нейтрофилов больных ХГБ в присутствии хелеритрина в течение 30 мин приводила к значительному подавлению НЕТоза (рис.1, Д и рис. Прилож.1Б), что указывало на участие в нем дополнительных субстратов РКС.

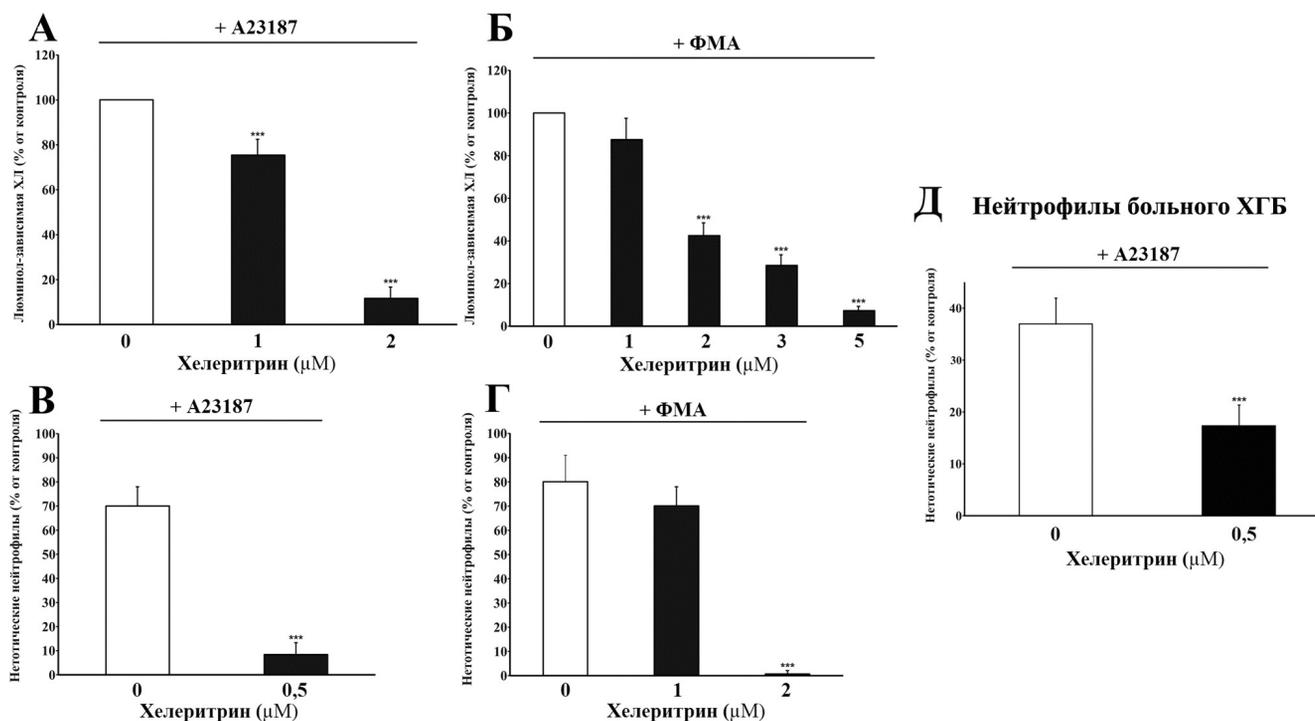


Рис. 1. Оценка участия протеинкиназы С в окислительном взрыве и НЕТозе нейтрофилов человека.

Свежевыделенные нейтрофилы человека инкубировали в присутствии специфического ингибитора РКС хелеритрина в течение 30 мин. Окислительный взрыв индуцировали 2 мкМ А23187 (А) или 30 нМ ФМА (Б). Продукцию АФК рассчитывали как площадь под кривыми люминолзависимой хемилюминесценции и выражали в процентах от контроля (контроль, 100% – стимулированные нейтрофилы).

Для оценки НЕТоза нейтрофилы здоровых доноров предварительно инкубировали на покровных стеклах с хелеритрином в течение 30 мин. Образование NET индуцировали 2 мкМ А23187 (В) или 30 нМ ФМА (Г) в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом и окрашивали SYBR Green для визуализации хроматина; $n = 5$; *** $p < 0,001$.

(Д) Нейтрофилы, выделенные из крови больных ХГБ, инкубировали в присутствии хелеритрина (0,5 мкМ) в течение 30 мин. Образование NET индуцировали 2 мкМ А23187 в течение 4 ч; $n = 3$; *** $p < 0,001$.

Таким образом, наши результаты подтвердили, что РКС участвует в НАДФН-оксидаза-зависимом окислительном взрыве, индуцированном A23187 и ФМА. Кроме того, процесс образования NET зависит не только от НАДФН-оксидазы, но и от РКС-зависимого фосфорилирования других неизвестных мишеней.

Роль различных изоформ РКС в окислительном взрыве и НЕТозе. Нам было интересно выяснить, какие изоформы РКС участвуют в НЕТозе, стимулированном A23187 и ФМА, поскольку ранее были получены противоречивые данные [21, 22]. Учитывая, что в нейтрофилах человека обнаружено всего пять изоформ РКС (α , β I, β II, δ и ζ), причем РКС α содержится в минорных количествах [23], мы использовали селективные ингибиторы РКС β (LY333531), РКС δ (роттлерин) и РКС ζ (псевдосубстрат РКС ζ).

Эффекты ингибиторов были исследованы на модели окислительного взрыва, индуцированного A23187 и ФМА. На рис. 2 (А, Б) можно видеть, что ингибиторы РКС β и РКС δ подавляли A23187-индуцированный окислительный взрыв эффективно и дозозависимым способом (подавление ингибитором РКС ζ не показано). Это указывает на то, что все три изоформы РКС участвуют в фосфорилировании субъединиц НАДФН-оксидазы. Однако в случае стимуляции ФМА только ингибиторы РКС β и РКС δ подавляли окислительный взрыв (рис. 2, В, Г), в то время как ингибитор изоформы РКС ζ был неэффективен (не показано). Этот результат согласуется с тем, что изоформа РКС ζ не чувствительна к ДАГ.

Действие ингибиторов РКС было исследовано при стимуляции НЕТоза как A23187, так и ФМА. Как показано на рис. 2 (Д, Е), ингибиторы изоформ РКС β и РКС ζ эффективно и дозозависимо подавляли A23187-индуцированный НЕТоз, что совпадало с ингибированием окислительного взрыва. Однако ингибитор РКС δ роттлерин, к нашему большому удивлению, был абсолютно неэффективен при использовании в широком диапазоне концентраций (не показано). В случае ФМА-стимулированного НЕТоза только ингибитор изоформы РКС β LY333531 оказывал на него подавляющее действие (рис. 2, Ж), в то время как ингибитор РКС ζ и роттлерин были неэффективны (не показано).

Таким образом, из полученных результатов видно, что хотя роттлерин подавлял окислительный взрыв, индуцированный A23187 и ФМА, НЕТоз в этих условиях не был подавлен. Мы можем объяснить это явление остаточной функцией НАДФН-оксидазы в случае ФМА-индуцированного НЕТоза и образованием митохондриальных АФК в случае A23187-индуцированного НЕТоза, как это происходит в нейтрофилах больных ХГБ [24].

Нам также было интересно выяснить, участвуют ли изоформы РКС (β , δ и ζ) в фосфорилировании других компонентов нетотического каскада

помимо НАДФН-оксидазы. Для этого мы исследовали НЕТоз, индуцированный A23187, в нейтрофилах больных ХГБ. Как показано на рис. 2 (З) и рис. Прилож.2, ингибиторы РКС β , РКС δ и РКС ζ подавляли A23187-индуцированный НЕТоз в нейтрофилах больных ХГБ. Таким образом, все три изоформы РКС участвуют в фосфорилировании иных мишеней, кроме субъединиц НАДФН-оксидазы, необходимых для образования NET.

Плейотропное действие роттлерина в нейтрофилах человека. В предыдущем разделе нашего исследования мы получили противоречивые данные о влиянии роттлерина на различные эффекторные функции нейтрофилов. С одной стороны, роттлерин ингибировал A23187- и ФМА-индуцированный окислительный взрыв, а с другой – не оказывал какого-либо действия на НЕТоз. Кроме того, роттлерин подавлял A23187-индуцированный НЕТоз в нейтрофилах больных ХГБ. Объяснение этих эффектов, возможно, связано с тем, что роттлерин, помимо ингибирования РКС δ , оказывает плейотропное действие на различные клетки [25].

Известно, что почти все иммунные реакции нейтрофилов, включая окислительный взрыв и НЕТоз, на определенной стадии требуют повышения уровня цитоплазматического Ca^{2+} . Нейтрофилы как невозбудимые клетки используют для генерации кальциевых сигналов депо-управляемые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны [26]. Однако, как недавно стало известно, в нейтрофилах имеются также потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCC) L-типа [27], больше характерные для возбудимых клеток. На модели хрусталика глаза мышей было показано, что роттлерин является агонистом кальциевых каналов L-типа [28].

Мы предположили, что роттлерин способствовал открытию этих каналов и повышению концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , компенсируя его действие как ингибитора РКС δ , снижающего активность НАДФН-оксидазы. Для доказательства нашей гипотезы мы использовали A23187 и ФМА в концентрациях, которые вызывали слабый НЕТоз (рис. 3). Добавление роттлерина на фоне таких доз стимуляторов вызывало дозозависимое повышение НЕТоза (рис. 3, А, Б). Чтобы подтвердить, что роттлерин усиливает НЕТоз, действуя на VGCC L-типа, мы использовали хорошо известный антагонист этих каналов, верапамил. На рис. 3 (В, Г) и рис. Прилож.3 видно, что стимуляция как A23187-, так и ФМА-индуцированного НЕТоза под действием роттлерина была подавлена верапамилом. Интересно, что верапамил не только компенсировал стимулирующее действие роттлерина, но и ингибировал НЕТоз, индуцированный A23187 и ФМА. Эти данные указывают на то, что как A23187, так и ФМА могут стимулировать открытие VGCC L-типа, что вносит существенный вклад в индукцию НЕТоза.

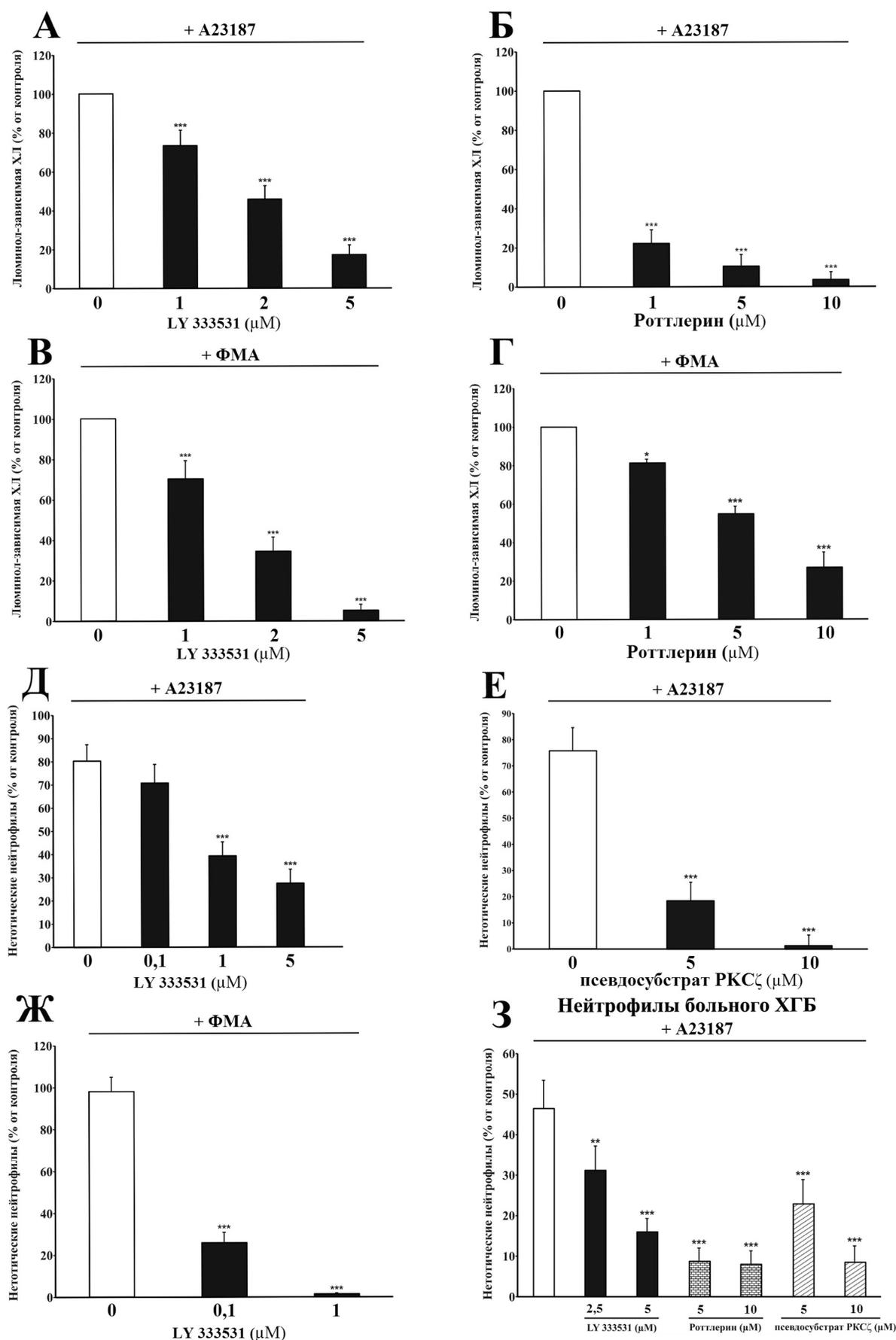


Рис. 2. Оценка участия изоформ РКС в окислительном взрыве и НЕТозе, индуцированных различными стимулами. Нейтрофилы инкубировали в присутствии селективных ингибиторов изоформ РКС LY333531 (ингибитор РКСβ) (А, В, Д, Ж, З), ротглерина (ингибитор РКСδ) (Б, Г, З) или псевдосубстрата РКСζ (ингибитор РКСζ) (Е, З) в течение 30 мин. Окислительный взрыв и НЕТоз индуцировали и анализировали как указано на рис. 1; n = 3; * p < 0,05; *** p < 0,001.

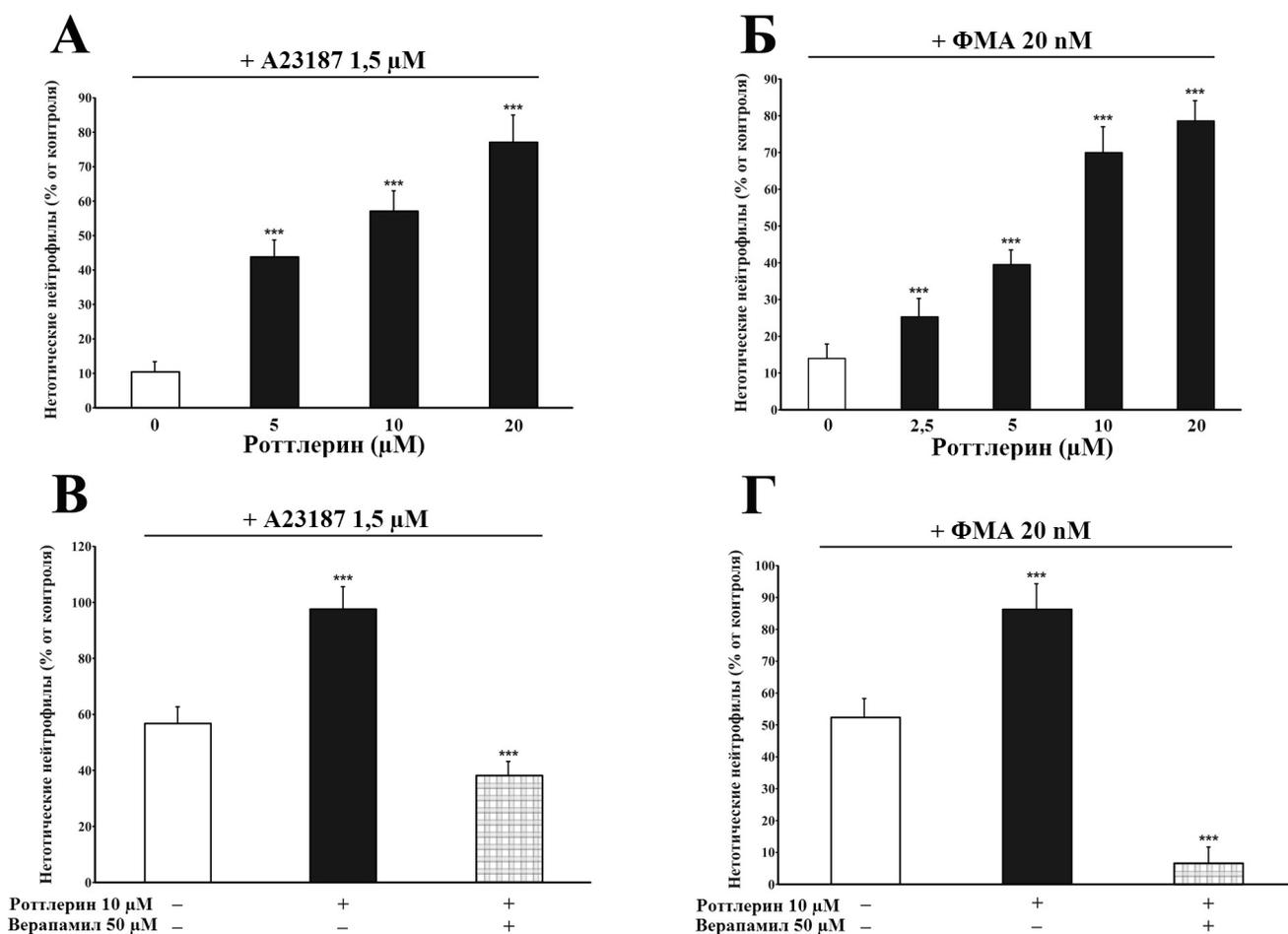


Рис. 3. Действие роттлерина на НЕТОз, индуцированный стимуляторами в низких дозах

(А, Б) Нейтрофилы здоровых доноров инкубировали в присутствии роттлерина в повышающихся концентрациях, далее проводили стимуляцию НЕТОза А23187 (1,5 мкМ) или ФМА (20 нМ) в низких дозах в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно.

(В, Г) Нейтрофилы инкубировали в присутствии 50 мкМ верапамила в течение 10 мин, далее добавляли 10 мкМ роттлерина и продолжали инкубацию в течение 30 мин. НЕТОз индуцировали 1,5 мкМ А23187 или 20 нМ РМА в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Клетки окрашивали и анализировали как указано на рис. 1; n = 3; *** p < 0,001.

В предварительных экспериментах мы показали, что роттлерин не вызывает НЕТОз в неактивированных нейтрофилах (данные не представлены). Это позволило предположить, что роттлерин действует как агонист VGCC L-типа лишь после деполяризации мембраны (которая сопровождается активацию нейтрофилов), как это происходит в возбудимых клетках. Деполяризация мембраны нейтрофилов возникает при активации НАДФН-оксидазы благодаря ее электрогенной функции [26]. В нейтрофилах больных ХГБ деполяризация мембраны не происходит, что предотвращает открытие VGCC L-типа под действием роттлерина, и в отсутствие компенсаторного эффекта роттлерин подавляет НЕТОз как ингибитор РКС δ .

Таким образом, наши результаты показали, что РКС δ критически важна для активации НЕТОза, по крайней мере, в нейтрофилах больных ХГБ. Вместе с тем полученные результаты не позволяют оценить роль РКС δ в НЕТОзе нейтрофилов здоровых доноров, поскольку ингибитор

РКС δ роттлерин является также агонистом VGCC L-типа и стимулирует НЕТОз, компенсируя возможный ингибиторный эффект.

Таким образом, в нашей работе было впервые показано, что кальциевый ионофор А23187 индуцирует окислительный взрыв и НЕТОз при участии классических (РКС β), новых (РКС δ) и атипичных (РКС ζ) изоформ РКС (рис. 2, 3). Наши результаты показали, что миметик ДАГ, ФМА, стимулировал окислительный взрыв при участии РКС β и РКС δ (рис. 2), в то время как для индукции НЕТОза доказано лишь участие РКС β .

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярные и клеточные основы иммунитета» (проект 21-1-21, номер ЦИТИС 121042600047-9). Исследования были одобрены локальным комитетом по этике Российской детской клинической больницы ФГАОУ ВО «РНМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава России. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F.* Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis // *J. Leukoc. Biol.* 1996. Vol. 59. N 2. P. 229–240.
2. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria // *Science.* 2004. Vol. 303. N 5663. P. 1532–1535.
3. *Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps // *J. Cell. Biol.* 2007. Vol. 176. N 2. P. 231–241.
4. *Steinberg B.E., Grinstein S.* Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death // *Sci. STKE.* 2007. Vol. 2007. N 379: pe11.
5. *Vorobjeva N.V., Pinegin B.V.* Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease // *Biochemistry (Mosc).* 2014. Vol. 79. N 12. P. 1286–1296.
6. *Pinegin B., Vorobjeva N., Pinegin V.* Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity // *Autoimmun. Rev.* 2015. Vol. 14. N 7. P. 633–640.
7. *Vorobjeva N.V., Chernyak B.V.* NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology // *Biochemistry (Mosc).* 2020. Vol. 85. N 10. P. 1178–1190.
8. *Vorobjeva N.V.* Neutrophil extracellular traps: new aspects // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. Vol. 75. N 4. P. 173–188.
9. *Metzler K.D., Goosmann C., Lubojemska A., Zychlinsky A., Papayannopoulos V.* A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis // *Cell. Rep.* 2014. Vol. 8. N 3. P. 883–896.
10. *Garcia-Romo G.S., Caielli S., Vega B., Connolly J., Allantaz F., Xu Z., Punaro M., Baisch J., Guiducci C., Coffman R.L., Barrat F.J., Banchereau J., Pascual V.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus // *Sci. Transl. Med.* 2011. Vol. 3. N 73: 73ra20.
11. *Keshari R.S., Jyoti A., Dubey M., Kothari N., Kohli M., Bogra J., Barthwal M.K., Dikshit M.* Cytokines induced neutrophil extracellular traps formation: implication for the inflammatory disease condition // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 10: e48111.
12. *Rada B.* Neutrophil extracellular traps and microcrystals // *J. Immunol. Res.* 2017. Vol. 2017: 2896380.
13. *Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., Bernuth H.V., Zychlinsky A.* Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways // *Elife.* 2017. Vol. 6: e24437.
14. *Babior B.M.* NADPH oxidase // *Curr. Opin. Immunol.* 2004. Vol. 16. N 1. P. 42–47.
15. *Steinberg S.F.* Mechanisms for redox-regulation of protein kinase C // *Front. Pharmacol.* 2015. Vol. 6: 128.
16. *Korchak H.M., Kilpatrick L.E.* Roles for beta II-protein kinase C and RACK1 in positive and negative signaling for superoxide anion generation in differentiated HL60 cells // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 12. P. 8910–8917.
17. *Waki K., Inanami O., Yamamori T., Nagahata H., Kuwabara M.* Involvement of protein kinase Cdelta in the activation of NADPH oxidase and the phagocytosis of neutrophils // *Free Radic. Res.* 2006. Vol. 40. N 4. P. 359–367.
18. *Bertram A., Ley K.* Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.).* 2011. Vol. 59. N 2. P. 79–87.
19. *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. Vol. 96. N 3. P. 254–265.
20. *Vorobjeva N.V., Pinegin B.V.* Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation // *Immunobiology.* 2016. Vol. 221. N 2. P. 208–219.
21. *Neeli I., Radic M.* Opposition between PKC isoforms regulates histone deimination and neutrophil extracellular chromatin release // *Front. Immunol.* 2013. Vol. 4: 38.
22. *Gray R.D., Lucas C.D., MacKellar A., Li F., Hiersemenzel K., Haslett C., Davidson D.J., Rossi A.G.* Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps // *J. Inflamm. (Lond.).* 2013. Vol. 10. N 1: 12.
23. *Dang P.M., Hakim J., Périanin A.* Immunochemical identification and translocation of protein kinase C zeta in human neutrophils // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 349. N 3. P. 338–342.
24. *Vorobjeva N., Galkin I., Pletjushkina O., Golyshev S., Zinovkin R., Prikhodko A., Pinegin V., Kondratenko I., Pinegin B., Chernyak B.* Mitochondrial permeability transition pore is involved in oxidative burst and NETosis of human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2020. Vol. 1866. N 5: 165664.
25. *Soltoff S.P.* Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 41. P. 37986–37992.
26. *Geiszt M., Kapus A., Németh K., Farkas L., Ligeti E.* Regulation of capacitative Ca²⁺ influx in human neutrophil granulocytes. Alterations in chronic granulomatous disease // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 42. P. 26471–26478.
27. *Harfi I., Corazza F., D'Hondt S., Sariban E.* Differential calcium regulation of proinflammatory activities in human neutrophils exposed to the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating protein // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175. N 6. P. 4091–4102.
28. *Xu S.Z.* Rottlerin induces calcium influx and protein degradation in cultured lenses independent of effects on protein kinase C delta // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2007. Vol. 101. N 6. P. 459–464.

Поступила в редакцию 03.02.2022

После доработки 01.05.2022

Принята в печать 20.05.2022

RESEARCH ARTICLE

The role of protein kinase C isoforms in the formation of neutrophil extracellular traps

N.V. Vorobjeva^{1,*} , S.S. Vakhlyarskaya², B.V. Chernyak³

¹*Department of Immunology, Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;*

²*Russian Children's Clinical Hospital, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117 Leninsky prospect, Moscow, 119571, Russia;*

³*A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie Gory, Moscow, 119992, Russia*

*e-mail: nvvorobjeva@mail.ru

Neutrophils release decondensed nuclear chromatin or neutrophil extracellular traps (NET) in response to a great number of physiological and pharmacological stimuli. However, apart from the host defensive function, NETs play an essential role in the pathogenesis of various autoimmune, inflammatory, and malignant diseases. Therefore, understanding the molecular mechanisms of NET formation, usually leading to the neutrophil death (NETosis), is important to control the consequences of aberrant or excessive NET release. Protein kinase C (PKC) is a serine/threonine kinase that is involved in a variety of neutrophil functions, but its role in NETosis is not well understood. Since five PKC isoforms (α , β I, β II, δ , and ζ) have been described in human neutrophils, we studied their contribution to NETosis and oxidative burst using inhibitory analysis. Using specific PKC isoform inhibitors, we have shown that PKC β , PKC δ , and PKC ζ are involved in the oxidative burst and NETosis activated by calcium ionophore A23187, while PKC β is involved in the oxidative burst and NETosis upon cell activation by diacylglycerol mimetic phorbol 12-myristate 13-acetate.

Keywords: *human neutrophils, neutrophil extracellular traps, NETosis, oxidative burst, protein kinase C isoforms*

Funding: The research was carried out within the framework of the project “Molecular and cellular bases of immunity” (project 21-1-21, CITIS no. 121042600047-9).

Сведения об авторах

Воробьева Нина Викторовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-46. e-mail: nvvorobjeva@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5233-9338>

Вахлярская Светлана Сергеевна – канд. мед. наук, врач-аллерголог-иммунолог отделения клинической иммунологии и ревматологии Российской детской клинической больницы. Тел.: 8-800-555-04-94; e-mail: vahlyarskaya@mail.ru

Черняк Борис Викторович – докт. биол. наук, проф., зав. лаб. биоэнергетики клетки НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-50; e-mail: bchernyak1@gmail.com

ПРИЛОЖЕНИЕ

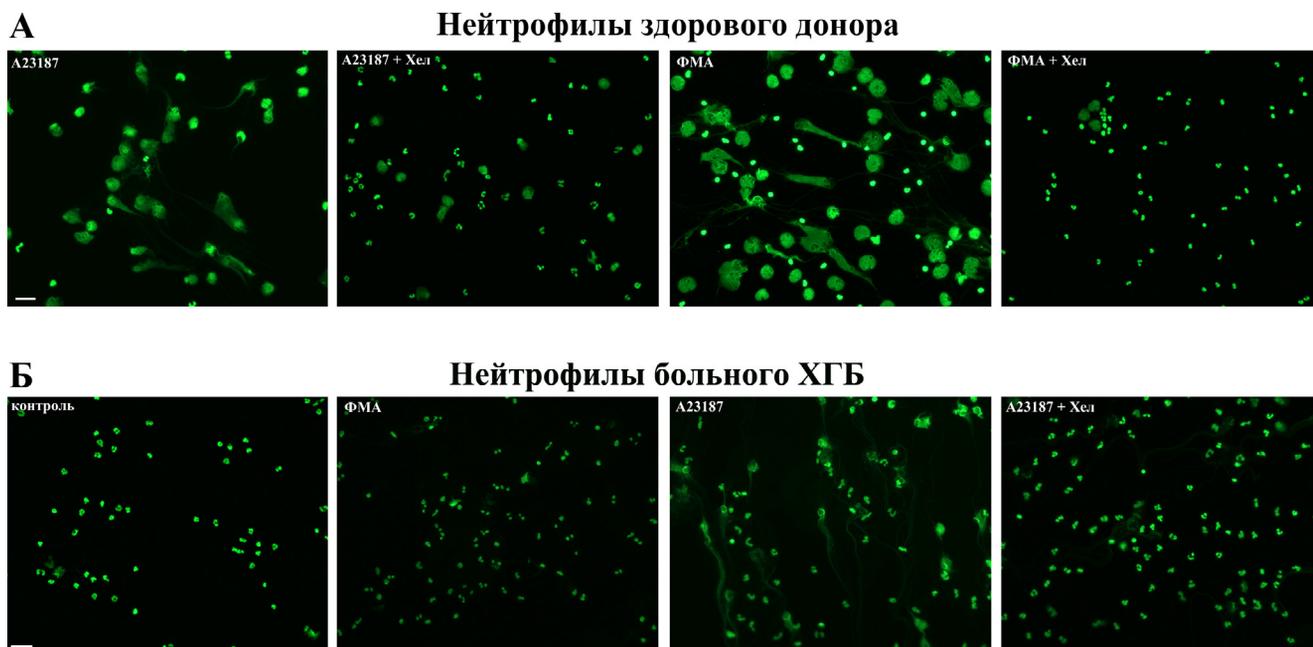


Рис. Прилож.1. Оценка участия протеинкиназы С в НЕТозе нейтрофилов человека. Представлены фотографии нейтрофилов здорового донора, инкубированные в присутствии хелеритрина и стимулированные A23187 и ФМА. Дозы хелеритрина в случае A23187- и ФМА-стимулированных нейтрофилов составляют 0,5 мкМ и 2 мкМ соответственно. Фотографии получены с помощью микроскопа Leica DM LB, оснащенного камерой Leica DC300F («Leica Microsystems», Германия). Масштаб – 25 мкм.

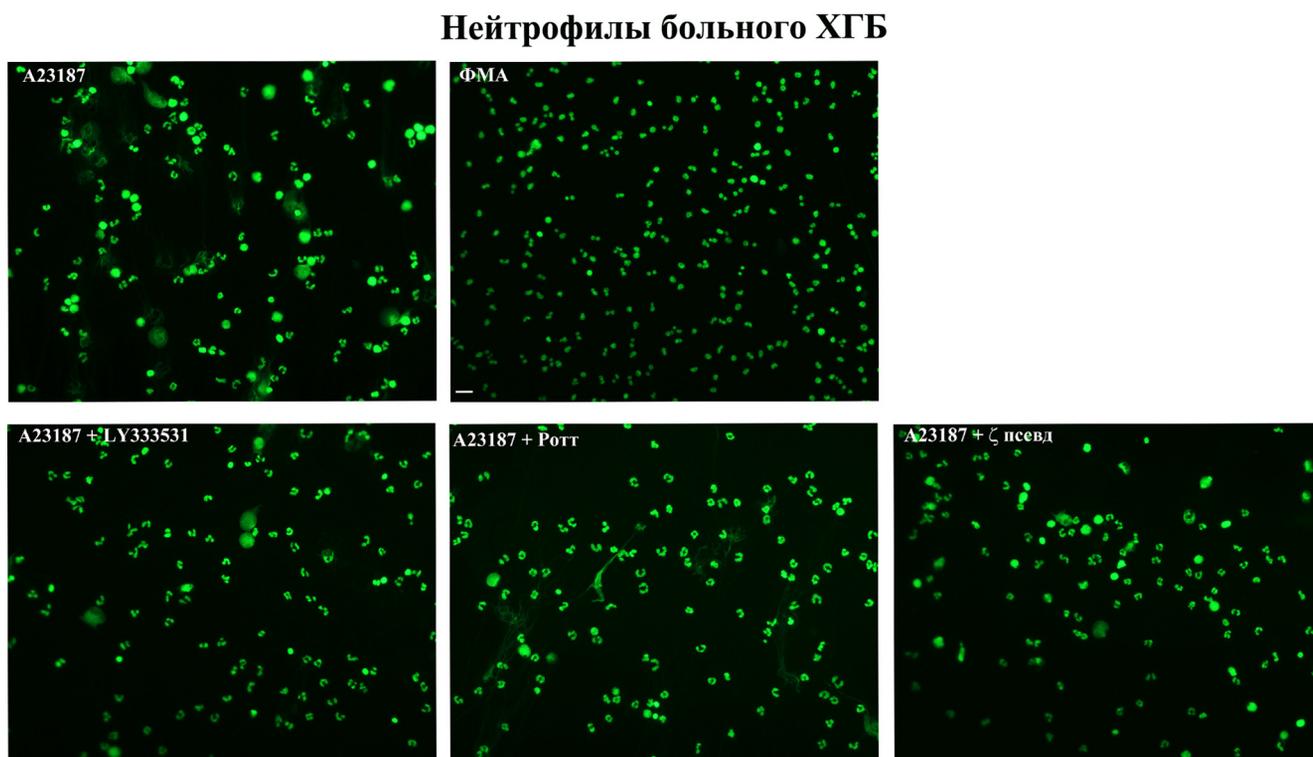


Рис. Прилож.2. Оценка участия изоформ РКС в A23187-индуцированном НЕТозе нейтрофилов пациентов с ХГБ. На фотографиях показаны нейтрофилы больного ХГБ, инкубированные в присутствии 5 мкМ LY333531, 10 мкМ роттлерина, 10 мкМ псевдосубстрата РКС ζ и стимулированные A23187. Масштаб – 25 мкм.

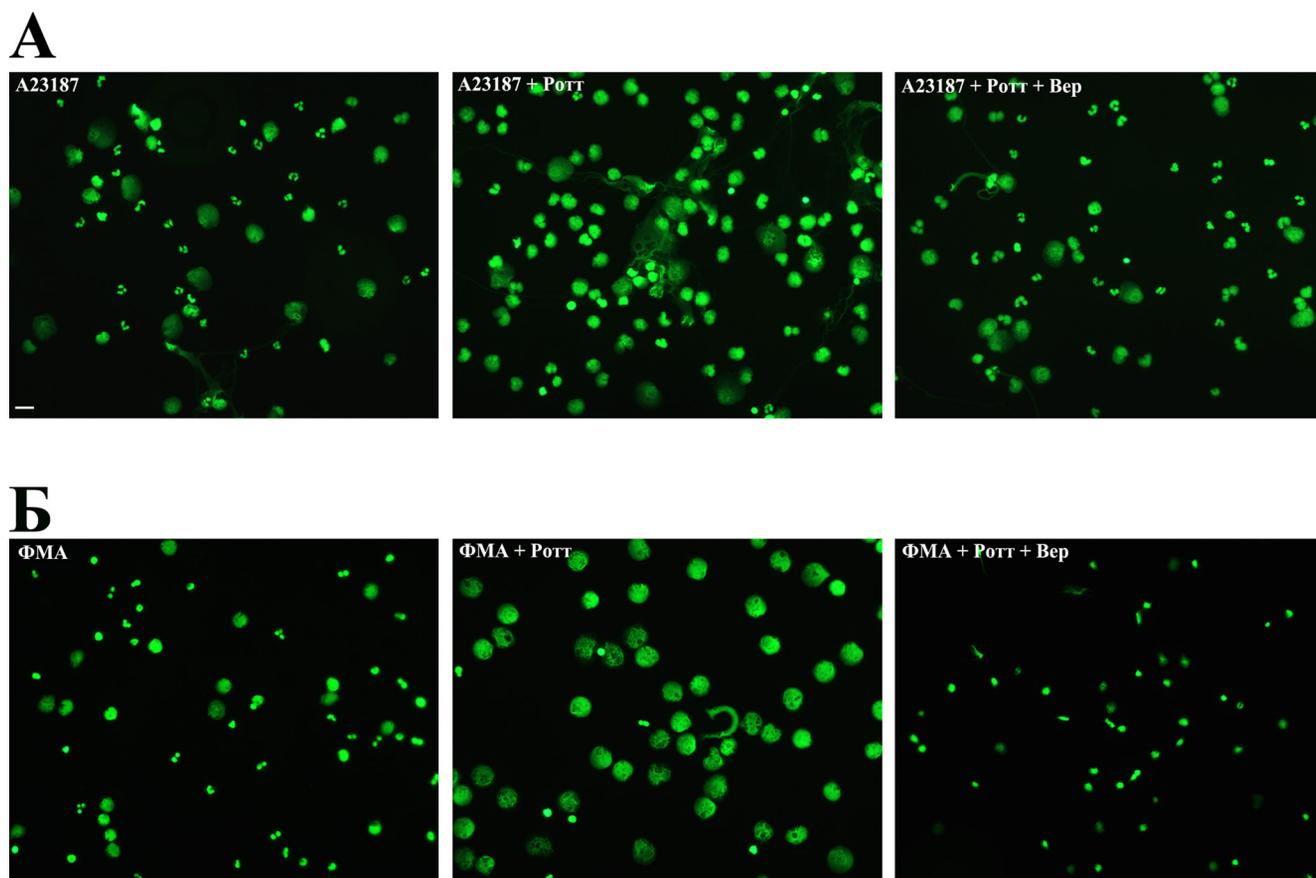


Рис. Прилож.3. Действие ротлерины на НЕТоз, индуцированный стимуляторами в низких дозах.

На фотографиях показаны нейтрофилы здорового донора, инкубированные в присутствии 50 мкМ верапамила в течение 10 мин, и 10 мкМ ротлерины – в течение последующих 30 мин. НЕТоз индуцировали слабыми дозами А23187 (1,5 мкМ) и РМА (20 нМ) в течение 4 ч и 2 ч 40 мин соответственно. Масштаб – 25 мкм.