

РАЗЛИЧИЕ ВЛИЯНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *E. COLI*,
ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЭТОМОКСИРА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКА ADRP
В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© 2019 г. Е. М. Фок¹, С. Д. Николаева¹, В. Т. Бахтеева¹,
Е. А. Лаврова¹, Р. Г. Парнова^{1, *}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: rimma_parnova@mail.ru

Поступила в редакцию 18.09.2019 г.

После доработки 26.09.2019 г.

Принята к публикации 26.09.2019 г.

Нейтральные липиды внутри клетки депонируются в липидных тельцах — особых клеточных органеллах, представляющих собой окруженное монослоем фосфолипидов ядро из триацилглицеринов (ТАГ) и эфиров холестерина и играющих центральную роль в клеточном метаболизме липидов. Биогенез липидных телец и расходование запасаемых липидов контролируется белками семейства PAT, которые экспрессируются на поверхности липидных телец, обеспечивают их взаимодействие с митохондриями и регулируют метаболизм содержащихся в них липидов за счет сопряжения с липазами. Представитель семейства PAT белок ADRP (adipose differentiation-related protein) является основным в количественном отношении белком поверхности липидных телец, экспрессирующимся во многих типах клеток. Задача данной работы состояла в исследовании участия ADRP в формировании липидных телец и по внутриклеточной аккумуляции ТАГ при действии различных стимулов — липополисахарида (ЛПС), экзогенной олеиновой кислоты и этомоксира, ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы 1. Объектом работы являлись эпителиальные клетки, выделенные с мукозной поверхности мочевого пузыря лягушки. Инкубация клеток в течение 21 ч с ЛПС *E. coli* (25 мкг/мл), олеиновой кислотой (50 мкМ) и этомоксиром (100 мкМ) приводила к значительному росту числа и размеров липидных телец и увеличению внутриклеточного накопления ТАГ. Несмотря на то, что все использованные вещества эффективно стимулировали рост липидных телец, только инкубация с ЛПС сопровождалась резким увеличением экспрессии белка ADRP, тогда как в присутствии этомоксира или олеиновой кислоты экспрессия данного белка не изменялась. Обнаруженные различия свидетельствуют о том, что молекулярные механизмы, лежащие в основе формирования липидных телец и аккумуляции ТАГ при действии разных стимулов в одном и том же типе клеток, могут различаться в отношении участия белков, экспрессирующихся на поверхности липидных телец.

Ключевые слова: липидные тельца, нильский красный, триацилглицерин, олеиновая кислота, этомоксир, липополисахарид *E. coli*, белок ADRP, эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки

DOI: 10.1134/S0869813919120045

Избыточное накопление липидов в клетках нежировой природы связано с такими серьезными патологиями как атеросклероз, ожирение, метаболический синдром,

диабет 2-го типа, стеатоз печени и др. Внутриклеточно липиды аккумулируются в липидных тельцах – специализированных органеллах цитоплазмы, встречающихся практически во всех типах клеток. Структурно они представляют собой ядро из нейтральных липидов, главным образом, триацилглицеринов (ТАГ) и эфиров холестерина, окруженное монослоем фосфолипидов. У эукариот липидные тельца образуются в эндоплазматическом ретикулуме: накопление нейтральных липидов между липидными монослоями мембраны ретикулума приводит к отщеплению липид-содержащей гранулы, окруженной липидным монослоем. Согласно современным представлениям, липидные тельца играют центральную роль в клеточном метаболизме липидов [1–4]. Находясь в тесной структурно-функциональной связи с митохондриями, они регулируют расход и синтез нейтральных липидов, являясь запасом строительных блоков для мембран клетки, защищают клетку от интоксикации избытком липидов (жирных кислот, церамида) и липофильных веществ, участвуют в регуляции уровня биоактивных липидов, имея в своей структуре не только субстраты для синтеза эйкозаноидов, но и ферменты, обеспечивающие синтез или высвобождение этих регуляторов – циклооксигеназу, липоксигеназу, фосфолипазу A2 и сопряженные с ними протеинкиназы [1, 3–7].

Интерес к липидным тельцам в большой степени был усилен открытием экспрессирующихся на их поверхности специфических белков семейства PAT (по первым буквам идентифицированных белков – *perilipin*, *ADRP*, *TIP47*), которые, как стало понятно в последнее десятилетие, играют ведущую роль в регуляции формирования и расхода липидных телец. В настоящее время семейство включает 5 белков, которые по современной номенклатуре получили название перилипины (*PLIN 1–5*). Эти белки регулируют образование липидных телец в структурах эндоплазматического ретикулума, их слияние, взаимодействие с другими клеточными органеллами, такими как митохондрии, а также метаболизм содержащихся в них липидов за счет сопряжения с липазами [8–12]. В различных типах клеток усиление экспрессии перилипинов сопровождается ростом липидных телец, что однозначно свидетельствует об их ключевой роли в торможении расхода ТАГ или усилении их синтеза, однако в зависимости от характера стимула и типа клеток в процесс роста липидных телец могут быть вовлечены различные перилипины. Белок *ADRP* (*adipose differentiation-related protein*) является основным в количественном отношении белком поверхности липидных телец [13]. Первоначально он был идентифицирован в адипоцитах, однако впоследствии его экспрессия была выявлена практически во всех исследованных типах клеток [14, 15]. Участие *ADRP* в регуляции формирования липидных телец доказано на нескольких клеточных моделях [16–18], однако данные по эпителиальным клеткам практически отсутствуют.

В наших предыдущих работах, выполненных на эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки, было показано, что значительное усиление образования липидных телец наблюдается при действии бактериального липополисахарида (ЛПС), экзогенных жирных кислот и при угнетении окисления жирных кислот этомоксиром [19, 20], ингибитором карнитин-пальмитоилтрансферазы 1, обеспечивающей перенос жирных кислот в митохондрии. Каждое из перечисленных воздействий, приводящих в конечном итоге к одному и тому же эффекту – усилению внутриклеточной аккумуляции липидов – основывается на специфических молекулярных механизмах. Убедившись в том, что эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки экспрессируют *ADRP*, мы поставили перед собой задачу на одном и том же типе клеток выяснить, является ли изменение экспрессии этого белка необходимым условием накопления липидных телец, стимулированного различными механизмами.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на изолированных эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки *Rana temporaria* L. Животных содержали в лаборатории при температуре 5°C в емкостях, на 1–1.5 см заполненных водой. Эксперименты выполняли в соответствии с протоколом обращения с лабораторными животными ИЭФБ РАН и требованиями и положениями директивы Европарламента 2010/63/ЕС 22.09.2010.

Реактивы. Культуральная среда Лейбовитца (L-15), липополисахарид *E. coli* (серотип 0127:B8), триолеилглицерин, этомоксир, олеиновая кислота – Sigma Chemicals, США; нильский красный - Invitrogen, США; гентамицин – Мосхимфармпрепараты им. Н.А.Семашко, Россия.

Выделение изолированных эпителиальных клеток. Внутреннюю полость мочевого пузыря у обездвиженной разрушением спинного мозга и вскрытой лягушки заполняли раствором, содержащим (в мМ): 85 NaCl, 4 KCl, 17.5 NaHCO₃, 0.8 KN₂PO₄, 2 глюкозы, 2 ЭДТА, 40 мкг/мл гентамицина, (рН 7.5) – раствор “А”. Пузыри перевязывали, извлекали и помещали в раствор того же состава на 50 мин в условия интенсивной аэрации. К концу этого времени клетки спонтанно отделялись от стенок пузыря. Полученные суспензии клеток фильтровали через четыре слоя газовой ткани и центрифугировали 10 мин при 100 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в растворе, содержащем (в мМ): 85 NaCl, 4 KCl, 17.5 NaHCO₃, 0.8 KN₂PO₄, 0.8 MgCl₂, 1.5 CaCl₂, 2 глюкозы, 40 мкг/мл гентамицина – раствор “Б”, и снова центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в стерильной культуральной среде следующего состава: 1 часть среды L-15 (Leibovitz) + 0.39 части H₂O. К модифицированной среде добавляли 40 мкг/мл гентамицина. Осмоляльность всех растворов и среды соответствовала осмоляльности плазмы крови лягушек и составляла 230 мосм/кг воды. Подсчет количества клеток осуществляли в камере Горяева. Полученные клетки инкубировали в лунках 24-луночного культурального планшета (1.2×10^6 клеток в объеме 250 или 300 мкл) в модифицированной среде L-15 в присутствии 40 мкг/мл гентамицина в течение 21 ч во влажной камере при 23°C. Рабочие концентрации анализируемых веществ, добавляемых в момент начала инкубации, составляли: ЛПС – 25 мкг/мл, этомоксир – 100 мкМ, олеиновая кислота – 50 мкМ. Раствор олеиновой кислоты приготавливался на спирту. Для того, чтобы избежать эффекта растворителя, аликвоту раствора олеиновой кислоты в объеме 3–5 мкл вносили в пустую лунку и высушивали на воздухе в течение нескольких минут, после чего добавляли клеточную суспензию.

Конфокальная микроскопия. Контрольные и опытные клетки инкубировали в камерах для конфокальной микроскопии (0.75×10^6 клеток в объеме 250 мкл) в модифицированной среде L-15. Концентрированный раствор нильского красного в диметилсульфоксиде в концентрации 1 мг/мл разбавляли в 1000 раз модифицированной культуральной средой L-15, 100 мкл этого раствора добавляли к 250 мкл суспензии клеток в конце инкубации. Микрофотографии получали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP-II (Leica – Microsystems, Германия). Флуоресценцию возбуждали при λ 488 нм, регистрируя испускаемый свет при λ 500–570 нм, объектив $\times 63$ с масляной иммерсией.

Экстракция липидов из эпителиальных клеток, тонкослойная хроматография липидного экстракта и определение количества ТАГ. Клетки инкубировали в лунках 24-луночного планшета (1.2×10^6 клеток в объеме 300 мкл) в течение 21 ч с добавками анализируемых веществ или без них. По окончании инкубации клетки собирали из лунок, отмывали, и экстрагировали суммарные липиды смесью хлороформ–метанола 2 : 1. В одну пробу собирали примерно 2.5×10^6 клеток. Полученные экстракты промывали 1/5 объема 0.75%-ного раствора KCl, центрифугировали

5 мин при 250 g, нижнюю фазу упаривали досуха, осадок липидов растворяли в 20 мкл смеси хлороформ–метанол (2 : 1) и затем наносили на хроматографическую пластинку DC-Alufolien (Merck, Германия). Хроматографию проводили в системе гексан–диэтиловый эфир–уксусная кислота (33 : 11.3 : 1, v/v). Пластинку проявляли в 20%-ном водном растворе H₂SO₄, затем нагревали до 150°C до проявления зон липидных классов, после чего фотографировали в стандартных условиях освещенности с помощью фотоаппарата Sony Cyber-Shot DSC-F828 (параметры съемки: F 2.5, S 60). ТАГ идентифицировали с помощью соответствующего стандарта. Денситометрический анализ проводили с помощью программ ImageJ и Microsoft Office Excel. Абсолютные количества ТАГ рассчитывали, исходя из количества нанесенного на пластинку стандартного раствора ТАГ.

Иммуноблоттинг. После окончания инкубации клетки промывали раствором “Б” и гомогенизировали в лизис-буфере (20 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25 mM EDTA, 0.1% Triton X-100 со смесью ингибиторов протеаз). Клеточный лизат смешивали с буфером для нанесения проб (200 mM Tris-HCl (pH 6.8), 400 mM β-меркаптоэтанола, 4% SDS, 40% глицерина, 0.01% красителя бромфеноловый синий), и подвергали нагреванию при 100°C в течение 3 мин. Пробы разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Whatman, Германия). Мембраны обрабатывали 5%-ным раствором обезжиренного молока на TBS-буфере, содержащем Tween 20, в течение 1 ч и инкубировали в течение ночи при 4°C с соответствующими антителами против ADRP (Santa Cruz Biotechnology, США) (1 : 750) и α/β-тубулина (Cell Signalling Technology, США; 1 : 1000). В качестве вторичных антител использовали anti-rabbit IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Vector, США) (1 : 3000). Для визуализации сигналов использовали ECL detection system (Thermo Scientific, США). Содержание исследуемого белка оценивали с помощью денситометрии с использованием программы ImageJ. В качестве внутреннего стандарта использовали α/β-тубулин.

Статистическая обработка результатов. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего значения. Статистическую обработку данных проводили, используя программу Microsoft Office Excel и статистического пакета AteStat, версия 13.1. Достоверность различий между контролем и опытом определяли с помощью метода однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация изолированных эпителиальных клеток в течение 21 ч с ЛПС (25 мкг/мл), этомоксиром (100 мкМ) или экзогенной олеиновой кислотой (50 мкМ) приводила к увеличению свечения нильского красного, специфического липидного красителя, при этом наблюдалось увеличение как количества липидных гранул, так и их размеров по сравнению с контролем (рис. 1). Измерение абсолютного количества ТАГ, аккумулируемых в клетках, показало, что все три воздействия приводят к значительному росту внутриклеточного содержания ТАГ (рис. 2А). Белок ADRP размером около 50 кДа экспрессируется в свежeweделенных клетках, инкубация клеток в течение 21 ч в контрольных условиях не приводит к изменению его экспрессии (рис. 2Б, В). Инкубация клеток с ЛПС сопровождалась резким увеличением экспрессии белка ADRP, тогда как в присутствии этомоксира или экзогенной олеиновой кислоты экспрессия ADRP не изменялась (рис. 2Б, В).

Локализованная на поверхности липидных телец регуляция внутриклеточного баланса нейтральных липидов является чрезвычайно сложным и тонко контролируемым процессом, в котором задействованы несколько типов липаз, каждая из которых может активироваться независимыми сигнальными путями, и перилипи-

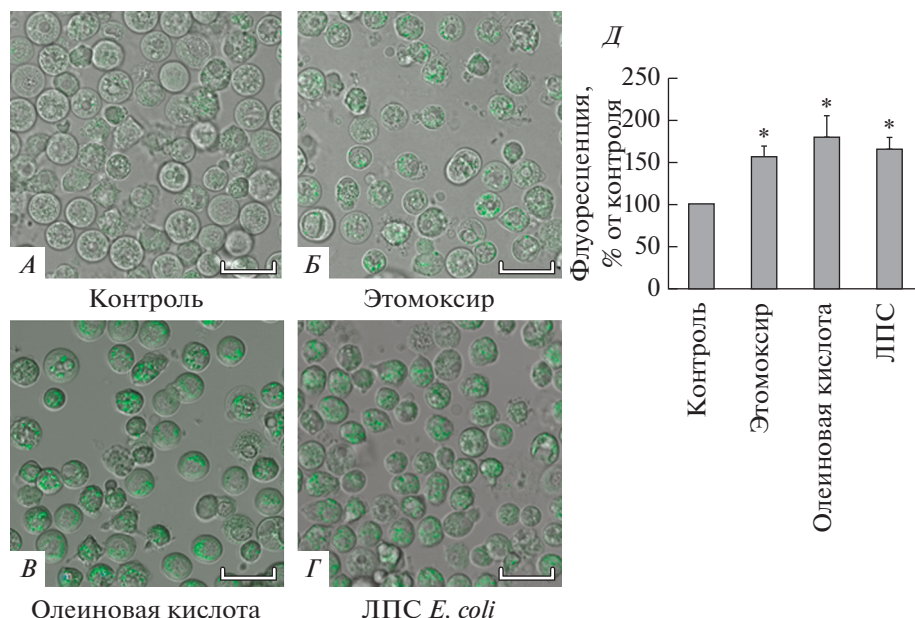


Рис. 1. (А–Г) Липидные тельца, окрашенные флуоресцентным красителем нильским красным, в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки в контроле и после 21-часовой инкубации с этомоксиром (100 мкМ), олеиновой кислотой (50 мкМ) и ЛПС (25 мкг/мл). Микрофотографии выполнены на конфокальном микроскопе Leica TCS SP-II (Leica – Microsystems, Германия). Флуоресценцию возбуждали при λ 488 нм, регистрируя испускаемый свет при λ 500–570 нм, объектив $\times 63$ с масляной иммерсией. Масштаб: 25 мкм. (Д) Количественный анализ флуоресценции нильского красного, % от контроля. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

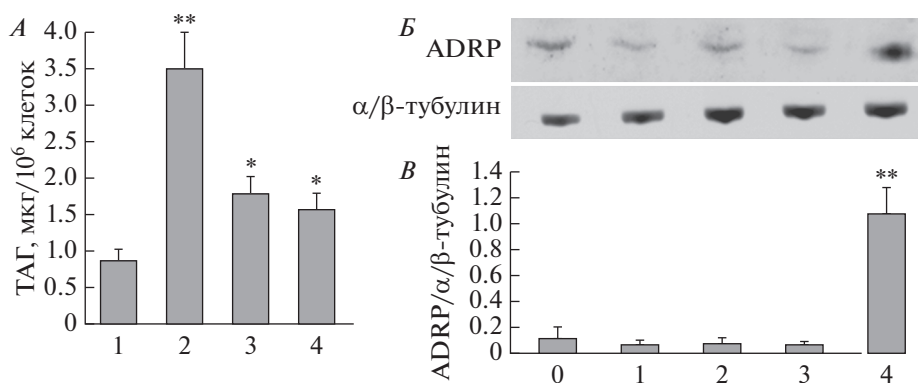


Рис. 2. (А) Денситометрический анализ внутриклеточного содержания ТАГ (в мкг/10⁶ клеток). 1 – контроль, 2 – этомоксир, 3 – олеиновая кислота, 4 – ЛПС *E.coli*. Данные представлены как среднее значение $\pm m$, $n = 9$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (Б, В) Экспрессия белка ADRP в эпителиальных клетках в контроле и при экспериментальных воздействиях. (Б) – репрезентативный иммуноблот, (В) – количественный анализ уровня экспрессии, представленный в виде отношения оптических плотностей ADRP к α/β -тубулину. 0 – начало инкубации (свежевыделенные клетки), 1 – контроль, 2 – этомоксир, 3 – олеиновая кислота, 4 – ЛПС *E.coli*. Данные представлены как среднее значение $\pm m$, $n = 4$. ** $p < 0.01$.

нов, регулирующих доступность липолитических ферментов к своему субстрату. Большинство данных литературы свидетельствует о вовлечении белка ADRP в процесс внутриклеточного запасания нейтральных липидов. Так, ингибирование его экспрессии в макрофагах и фибробластах с помощью siRNA приводило к снижению образования липидных телец, а оверэкспрессия — к значительному увеличению [16–18]. Полученные нами результаты о резком усилении экспрессии ADRP в эпителиальных клетках при действии ЛПС однозначно свидетельствуют о вовлечении поверхностного белка липидных гранул в изменение внутриклеточного метаболизма нейтральных липидов при действии этого стимула в эпителиальных клетках. Это полностью соответствует данным литературы, полученным на других типах клеток. Так, усиление экспрессии ADRP при действии ЛПС показано в клетках микроглии [21], макрофагах [22, 23], фибробластах [18]. ЛПС-стимулированное усиление экспрессии ADRP происходит на уровне транскрипции [21], ингибирование его экспрессии с помощью siRNA снижает образование липидных телец [18]. Молекулярный механизм участия ADRP в ЛПС-стимулированном накоплении липидных телец далек от понимания, однако, можно предположить, что этот белок связывается с липазой, специфичной к ТАГ (ATGL, adipocyte triglyceride lipase), лишая ее доступа к своему субстрату, что, в свою очередь, приводит к торможению гидролиза ТАГ и накоплению его в липидных тельцах [24]. Задействован ли подобный механизм в эффекте ЛПС, остается однако невыясненным. По нашим данным первичной мишенью действия ЛПС в эпителиальных клетках мочевого пузыря лягушки является не угнетение гидролиза ТАГ, а снижение окисления жирных кислот за счет образования активных форм кислорода в митохондриях, которое приводит к увеличению концентрации свободных жирных кислот в цитозоле и увеличению включения ацил-КоА в ТАГ [20]. В такой ситуации “упрятывание” жирных кислот в липидные тельца в составе ТАГ может рассматриваться как механизм, защищающий клетку от избытка свободных жирных кислот в цитозоле. Это соответствует данным работы [17], в которой показано, что механизм стимулирующего действия ADRP на образование липидных телец связан со снижением окисления жирных кислот и увеличением включения ацил-КоА в ТАГ.

Действие экзогенной олеиновой кислоты и этомоксира основано на различных механизмах, но оба воздействия в конечном итоге приводят к повышению внутриклеточного уровня свободных жирных кислот. В случае олеиновой кислоты увеличивается ее транспорт через плазматическую мембрану, тогда как в присутствии этомоксира, ингибитора карнитин-пальмитоилтрансферазы 1, обеспечивающей перенос жирных кислот в матрикс митохондрий, снижается окисление жирных кислот. На используемой в настоящем исследовании клеточной модели нами было подтверждено, что этомоксир снижает окисление жирных кислот и вызывает увеличение свободных жирных кислот в цитозоле [25]. Как и другие типы клеток, эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки отвечают на действие экзогенной олеиновой кислоты и этомоксира усилением формирования липидных телец. Подобный эффект, вызываемый увеличением внутриклеточного содержания свободных жирных кислот, был показан на многих типах клеток [26, 27]. Считается, что в его основе лежит усиление синтеза ТАГ за счет увеличения субстрата для ацил-КоА-синтетазы [26], что обеспечивает защиту клетки от липотоксического действия свободных жирных кислот в цитозоле. Несмотря на то, что этомоксир и экзогенная олеиновая кислота приводили к усилению формирования липидных телец и аккумуляции ТАГ, нами не было обнаружено изменение экспрессии ADRP. Эти данные не согласуются с данными литературы по млекопитающим, полученным, главным образом, на мышинных моделях — на клетках микроглии [21], линии клеток NMuLi из печени [28], макрофагах [29], на линии адипогенных клеток 1246 [30]. Можно предположить, что усиление формирования липидных телец в эпителиаль-

ных клетках при повышении внутриклеточной концентрации свободных жирных кислот может быть сопряжено с другими белками семейства PAT, ассоциированными с их поверхностью. Данные литературы свидетельствуют о вовлечении в процесс формирования липидных телец белков Tir47 [31, 32], PLIN5 [33–36]. ЛПС *Porphyromonas gingivalis* усиливал накопление липидов в нейтрофилах крови, при этом наблюдалось увеличение экспрессии только Tir47, тогда как экспрессия PLIN1, ADRP и PLIN5 не изменялась [37].

Можно предположить, что в этом процессе принимают участие и неидентифицированные на сегодняшний день белки. Так, на линии эмбриональных клеток, полученных от мышей нокаутных по ADRP, было показано, что способность к формированию липидных телец при нагрузке олеиновой кислотой сохраняется даже в том случае, если затормозить экспрессию Tir47 с помощью siRNA [32]. siRNA-опосредованное ингибирование транскрипции ADRP не уменьшало накопление липидов, стимулированное HIF1 (hypoxia inducible factor-1) в культуре клеток MCF7 [38].

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что в отношении внутриклеточной аккумуляции липидов при действии ЛПС или в условиях экзогенной или эндогенной нагрузки жирными кислотами эпителиальные клетки мочевого пузыря лягушки не имеют каких-либо специфических особенностей по сравнению с другими типами клеток — данные воздействия приводят к увеличению формирования липидных телец и аккумуляции ТАГ. Однако усиление экспрессии белка ADRP, которым обычно сопровождается рост этих органелл, наблюдается в исследованном временном диапазоне только при действии ЛПС, что свидетельствует о различном участии перилипинов в механизмах формирования липидных телец при действии разных стимулов. Дальнейшие исследования требуются для того, чтобы понять, является ли обнаруженный факт особенностью эпителиальных клеток или отражает видо-специфичность нашей клеточной модели.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФАНО России (тема № АААА-А18-118012290371-3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fujimoto Y., Onoduka J., Homma K.J., Yamaguchi S., Mori M., Higashi Y., Makita M., Kinoshita T., Noda J., Itabe H., Takanoa T. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol. Pharm. Bull.* 29(11): 2174–2180. 2006.
2. Ohsaki Y., Suzuki M., Fujimoto T. Open questions in lipid droplet biology. *Chemistry & Biology.* 21: 86–96. 2014.
3. Walther T., Farese R. The life of lipid droplets. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791(6): 459–466. 2009.
4. Welte M.A., Gould A.P. Lipid droplet functions beyond energy storage. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Biol. Lipids.* 1862: 1260–1272. 2017.
5. Bozza P., Bakker-Abreu I., Navarro-Xavier RA, Bandeira-Melo C. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids.* 85: 205–213. 2011.
6. Johnson M., Vaughn B., Triggiani M., Swan D., Fonteh A., Chilton F. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am. J. Respir Cell. Mol. Biol.* 21: 253–258. 1999.
7. Olofsson S., Bostrom P., Andersson L., Rutberg M., Perman J., Borén J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791(6): 448–458. 2009.
8. Bickel P.E., Tansey J.T., Welte M.A. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta.* 1791: 419–440. 2009.

9. *Brasaemle D.* Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48(12): 2547–2559. 2007.
10. *Londos C., Sztalryd C., Tansey J., Kimmel A.* Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 87(1): 45–49. 2005.
11. *Ształryd C., Kimmel A.R.* Perilipins: lipid droplet coat proteins adapted for tissue-specific energy storage and utilization, and lipid cytoprotection. *Biochimie.* 96: 96–101. 2014.
12. *Wolins N., Rubin B., Brasaemle D.* TIP47 associates with lipid droplets. *J. Biol. Chem.* 276: 5101–5108. 2001.
13. *Chang B.H., Chan L.* Regulation of Triglyceride Metabolism. III. Emerging role of lipid droplet protein ADFP in health and disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292(6): G1465–G1468. 2007.
14. *Brasaemle D.L., Barber T., Wolins N.E., Serrero G., Blanchette-Mackie E.J., Londos C.* Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38(11): 2249–2263. 1997.
15. *Heid H.W., Moll R., Schwetlick I., Rackwitz H.R., Keenan T.W.* Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294(2): 309–321. 1998.
16. *Imamura M., Inoguchi T., Ikuyama S., Taniguchi S., Kobayashi K., Nakashima N., Nawata H.* ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283(4): E775–E783. 2002.
17. *Larigauderie G., Cuaz-Pérolin C., Younes A.B., Furman C., Lasselin C., Copin C., Jaye M., Fruchart J.C., Rouis M.* Adipophilin increases triglyceride storage in human macrophages by stimulation of biosynthesis and inhibition of beta-oxidation. *FEBS J.* 273: 3498–3510. 2006.
18. *Wang J., Si Y., Wu C., Sun L., Ma Y., Ge A., Li B.* Lipopolysaccharide promotes lipid accumulation in human adventitial fibroblasts via TLR4-NF- κ B pathway. *Lipids Health Dis.* 11: 139. 2012. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-139>
19. *Федорова Е.В., Фок Е.М., Бахтеева В.Т., Лаврова Е.А., Парнова Р.Г.* Триацилглицерины липидных телец как место депонирования экзо- и эндогенных ненасыщенных жирных кислот при повышении их концентрации в эпителиальных клетках. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 100(8): 964–977. 2014. [*Fedorova E.V., Fok E.M., Bakhteeva V.T., Lavrova E.A., Parnova R.G.* Deposition of exogenous and endogenously generated unsaturated fatty acids in lipid droplets triacylglycerol as a mechanism of its sequestration in epithelial cells. *Russ. J. Physiol.* 100(8): 964–978. 2014. (In Russ.)].
20. *Fock E., Bachtееva V., Lavrova E., Parnova R.* Mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ prevents *E. coli* lipopolysaccharide-induced accumulation of triacylglycerol and lipid droplets biogenesis in epithelial cells. *J. Lipids.* Article ID 5745790. 11 pages. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5745790>
21. *Khatchadourian A., Bourque S.D., Richard V.R., Titorenko V.I., Maysinger D.* Dynamics and regulation of lipid droplet formation in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated microglia. *Biochim. Biophys. Acta.* 1821: 607–617. 2012.
22. *Feingold K.R., Kazemi M.R., Magra C.M., McDonald C.M., Chui J.K., Shigenaga J.K., Patzek S.M., Chan Z.W., Londos C., Grunfeld C.* ADRP/ADFP and Mall expression are increased in macrophages treated with TLR4 agonists. *Atherosclerosis.* 209: 81–88. 2010.
23. *Feingold K.R., Shigenaga J.K., Kazemi M.R., McDonald C.M., Patzek S.M., Cross A.S., Moser A., Grunfeld C.* Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 92: 829–839. 2012.
24. *Listenberger L.L., Ostermeyer-Fay A.G., Goldberg E.B., Brown W.J., Brown D.A.* Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J. Lipid Res.* 48: 2751–2761. 2007.
25. *Fock E., Lavrova E., Bachtееva V., Nikolaeva S., Parnova R.* Suppression of fatty acid β -oxidation and energy deficiency as a cause of inhibitory effect of *E. coli* lipopolysaccharide on osmotic water transport in the frog urinary bladder. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 218: 81–87. 2019.
26. *Fujimoto T., Ohsaki Y., Cheng J., Suzuki M., Shinohara Y.* Lipid droplets: A classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell. Biol.* 130(2): 263–279. 2008.
27. *Weller P.F., Ryeom S.W., Picard S.T., Ackerman S.J., Dvorak A.M.* Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J. Cell. Biol.* 113(1): 137–146. 1991.
28. *Fan B., Ikuyama S., Gu J.Q., Wei P., Oyama J., Inoguchi T., Nishimura J.* Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297(1): E112–E123. 2009.

29. Wei P., Taniguchi S., Sakai Y., Imamura M., Inoguchi T., Nawata H., Oda S., Nakabeppu Y., Nishimura J., Ikuyama S. Expression of adipose differentiation-related protein is conjointly regulated by PU.1 and AP-1 in macrophages. *J. Biochem.* 138: 399–412. 2005.
30. Gao J., Ye H., Serrero G. Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *J. Cell. Physiol.* 182(2): 297–302. 2000.
31. Grasselli E., Voci A., Pesce C., Canesi L., Fugassa E., Gallo G., Vergani L. PAT protein mRNA expression in primary rat hepatocytes: Effects of exposure to fatty acids. *Int. J. Mol. Med.* 25(4): 505–512. 2010.
32. Sztalryd C., Bell M., Lu X., Mertz P., Hickenbottom S., Chang B.H., Chan L., Kimmel A.R., London C. Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line. *J. Biol. Chem.* 281(45): 34341–34348. 2006.
33. Jin Y., Tan Y., Chen L., Liu Y., Ren Z. Reactive Oxygen Species Induces Lipid Droplet Accumulation in HepG2 Cells by Increasing Perilipin 2 Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 2018. 19(11). pii: E3445.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113445>
34. Kimmel A.R., Sztalryd C. Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization. *Curr. Opin. Lipidol.* 25(2): 110–117. 2014.
35. Wang H., Sreenivasan U., Hu H., Saladino A., Polster B.M., Lund L.M., Gong D.W., Stanley W.C., Sztalryd C. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J. Lipid Res.* 52(12): 2159–2168. 2011.
36. Zhong W., Fan B., Cong H., Wang T., Gu J. Oleic acid-induced perilipin 5 expression and lipid droplets formation are regulated by the PI3K/PPAR α pathway in HepG2 cells. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 44(8): 840–848. 2019.
37. Nose F., Yamaguchi T., Kato R., Aiuchi T., Obama T., Hara S., Yamamoto M., Itabe H. Crucial role of perilipin-3 (TIP47) in formation of lipid droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophils. *PLoS One.* 2013. 8(8): e71542.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071542>
38. Shen G., Ning N., Zhao X., Liu X., Wang G., Wang T., Zhao R., Yang C., Wang D., Gong P., Shen Y., Sun Y., Zhao X., Jin Y., Yang W., He Y., Zhang L., Jin X., Li X. Adipose differentiation-related protein is not involved in hypoxia inducible factor-1-induced lipid accumulation under hypoxia. *Mol. Med. Rep.* 12(6): 8055–8061. 2015.

Different Effects of *E. coli* Lipopolysaccharide, Oleic Acid and Etomoxir on the Expression of ADRP Protein in Epithelial Cells

E. M. Fock^a, S. D. Nikolaeva^a, V. T. Bachtееva^a,
E. A. Lavrova^a, and R. G. Parnova^{a, *}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

*e-mail: rimma_parnova@mail.ru

Abstract—Intracellularly neutral lipids are deposited in lipid bodies (LB) – special organelles composed of triglyceride or cholesterol esters core surrounded by a phospholipid monolayer. LBs play a central role in cellular lipid metabolism. The biogenesis of LB and consumption of neutral lipids are controlled by proteins of the PAT family, which are expressed on the surface of LB and regulate lipids storage and degradation providing the interaction of LB with mitochondria and access of lipases to their substrates. The ADRP (adipose differentiation-related protein), a member of the PAT family, is a quantitatively major LB surface protein expressed in many cell types. The goal of the present work was to study the involvement of ADRP in the formation of LB and intracellular TAG accumulation under the action of different stimuli –lipopolysaccharide (LPS), exogenous oleic acid and etomoxir, an inhibitor of carnitine-palmitoyltransferase 1. The experiments were performed on epithelial cells isolated from the mucosal surface of the frog urinary bladder. Incubation of the cells for 21 hours with *E. coli* LPS (25 μ g/ml), oleic acid (50 μ M) and etomoxir (100 μ M) led to a significant increase in the number and size of LBs and an increase in intracellular TAG accumulation. Despite the fact that all the substances used effectively stimulated LB growth, only incubation with LPS was accompanied by a sharp increase in the expression of ADRP protein, whereas in the presence of etomoxir or oleic acid the expression of this protein did not change. The ob-

tained results indicate that the molecular mechanisms underlying the increase in LB formation and TAG accumulation under the action of different stimuli in the same cell type can be differed in relation to the involvement of LB surface proteins.

Keywords: lipid bodies, Nile red, triacylglycerol, oleic acid, etomoxir, lipopolysaccharide *E.coli*, ADRP protein, frog urinary bladder epithelial cells

ЦИТИРОВАТЬ:

Е.М. Фок, С.Д. Николаева, В.Т. Бахтеева, Е.А. Лаврова, Парнова Р.Г. Различие влияния липополисахарида *E. coli*, олеиновой кислоты и этомоксира на экспрессию белка ADRP в эпителиальных клетках. Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 105(12): 1571–1580.

DOI: 10.1134/S0869813919120045

TO CITE THIS ARTICLE:

Fock E.M., Nikolaeva S.D., Bachtееva V.T., Lavrova E.A., Parnova R.G. Different Effects of *E. coli* Lipopolysaccharide, Oleic Acid and Etomoxir on the Expression of ADRP Protein in Epithelial Cells. Russian Journal of Physiology. 105(12): 1571–1580.

DOI: 10.1134/S0869813919120045