

УДК 571.27

# Изучение способности лигандов рецептора NOD1 активировать транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B в условиях *in vitro* и *in vivo*

А. И. Тухватулин<sup>1\*</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, И. И. Гитлин<sup>2</sup>, М. М. Шмаров<sup>1</sup>, П. В. Кудан<sup>1</sup>,  
А. А. Аджиева<sup>1</sup>, А. Ф. Мороз<sup>1</sup>, Н. Н. Костюкова<sup>1</sup>, Л. Г. Бурделя<sup>2</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>,  
А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>, А. В. Гудков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>Roswell Park Cancer Institute, Elm & Carlton Streets, Buffalo, New York, USA

\*E-mail: amir\_tuhvatulin@yahoo.com

Поступила в редакцию 31.01.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Паттерн-распознающие рецепторы (pattern-recognition receptors (PRR)) выполняют важные функции в формировании реакций иммунной защиты организма против развивающейся бактериальной или вирусной инфекции. Распознавая специфические высококонсервативные последовательности в структуре патогенов, паттерн-распознающие рецепторы индуцируют развитие различных реакций как врожденного, так и приобретенного иммунитета. Наряду с наиболее изученными Toll-подобными рецепторами в распознавании патогена принимают участие рецепторы, принадлежащие к другим семействам PRR, в том числе NOD-подобные рецепторы. Связывание собственных лигандов NOD-подобными рецепторами – NOD1 и NOD2, а также Toll-подобными рецепторами приводит к активации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, регулирующего экспрессию различных генов, продукты которых участвуют в развитии различных провоспалительных реакций. В отличие от Toll-подобных рецепторов, NF- $\kappa$ B-активирующая способность NOD-рецепторов на сегодняшний день описана в недостаточной степени.

Нами изучена способность одного представителя семейства NOD-подобных рецепторов – NOD1, активировать основной провоспалительный фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, а также проведена сравнительная характеристика способности лигандов NOD1-рецептора с различной структурой и лигандов Toll-подобных рецепторов 4 и 5 активировать NF- $\kappa$ B в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** паттерн-распознающие рецепторы, Toll-подобные рецепторы, NOD1-рецептор, фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, пептидогликан грамотрицательных бактерий.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** NF- $\kappa$ B – ядерный фактор  $\kappa$ B (nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells); AP-1 – активирующий протеин-1 (activator protein 1); TLR – Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor); PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns); DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (damage-associated molecular patterns); PRR – паттерн-распознающие рецепторы (pattern-recognition receptors); TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha); ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; IRF – интерферонрегулирующий фактор (interferon regulatory factor); NLR – NOD-подобные рецепторы (NOD-like-receptor); RLR – RIG-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors); ЛПС – липополисахарид.

## ВВЕДЕНИЕ

До недавнего времени механизмы распознавания инфекционных агентов клетками макроорганизма, а также молекулярные механизмы активации реакций врожденного и приобретенного иммунитета в ответ на развивающуюся инфекцию оставались малоизученными.

Важным шагом в понимании этих механизмов стало обнаружение около 20 лет назад первых представителей паттерн-распознающих рецепторов (PRR) врожденного иммунитета – Toll-подобных рецепторов (TLR) [1].

Сегодня известно семь семейств PRR: Toll-подобные рецепторы, NOD (nucleotide-oligomerization

domain)-подобные рецепторы (NLR), RIG-подобные рецепторы (RLR), рецепторы лектинового типа и др. [2]. Представители этих семейств способны узнавать специфичный для каждого из них набор высококонсервативных фрагментов экзогенных молекул, ассоциированных с патогенными микроорганизмами (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), а также некоторых эндогенных молекул, ассоциированных с повреждением собственных клеток макроорганизма (damage-associated molecular patterns, DAMP). Связывание собственных лигандов с паттерн-распознающими рецепторами приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, вызывающих, в конечном итоге, активацию ряда факторов транскрипции (AP-1, NF- $\kappa$ B, IRF 1, 3, 5, 7 и др.), регулирующих развитие тех или иных реакций иммунного ответа.

NF- $\kappa$ B – основной провоспалительный фактор, регулирующий экспрессию ряда молекул, которые могут принимать участие в развитии реакций как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа: секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов, синтезе антимикробных пептидов, индукции фагоцитозной активности макрофагов, созревании дендритных клеток и др. [3].

Одними из паттерн-распознающих рецепторов, активация которых приводит к индукции NF- $\kappa$ B, являются Toll-подобные рецепторы, а также открытые сравнительно недавно представители подсемейства NOD-подобных рецепторов – NOD-рецепторы 1 и 2.

Toll-подобные рецепторы – это трансмембранные белки, локализованные на поверхности плазматической мембраны клеток, а также в составе внутриклеточных компартментов (эндосом). Лигандами Toll-подобных рецепторов могут служить молекулы различной химической природы и структуры, такие, как липополисахариды (ЛПС), флагеллин, бактериальные липопептиды, бактериальная и вирусная ДНК и другие. Получены многочисленные данные, характеризующие способность лигандов TLR активировать NF- $\kappa$ B как *in vitro*, так и *in vivo* [4]. Опосредованная NF- $\kappa$ B-способностью лигандов TLR запускать различные реакции иммунной системы позволяет использовать лиганды в качестве средств немедленной защиты от патогенов, молекулярных адъювантов и т.д. [5–7].

Представители другого семейства PRR – NOD-рецепторы, располагаются непосредственно в цитоплазме клеток и распознают различные молекулы, представляющие собой фрагменты пептидогликана грамположительных и грамотрицательных бактерий. Показано, что NOD-рецепторы участвуют в распознавании бактерий, способных выходить из эндосомного пространства в цитоплазму клеток и запускать

ответные специфические иммунные реакции [8]. В отличие от лигандов TLR, свойства лигандов NOD-рецепторов, включая их способность активировать NF- $\kappa$ B, изучены значительно меньше.

Цель представленной работы состояла в сравнительном анализе NF- $\kappa$ B-активирующей способности лигандов одного представителя NOD-рецепторов – NOD1, и лигандов TLR 4 и 5 в условиях *in vitro* и *in vivo*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

NF- $\kappa$ B-активирующую способность лигандов NOD1 и Toll-подобного рецептора 5 в условиях *in vitro* изучали с использованием клеточных линий HEK293 (эпителий эмбриональной почки человека), а также HCT116 (рак прямой кишки человека), экспрессирующих NOD1 человека. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 об.% фетальной бычьей сыворотки (кат. номер SV30160.03, Hyclone, США), 1 мг/мл глутамин (кат. номер. Ф032, ПанЭко, Россия), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (кат. номер А065, ПанЭко, Россия) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Клетки рассевали в отношении 1 : 6 на вторые сутки при достижении монослоя.

### Лиганды NOD1 и Toll-подобных рецепторов

Химически синтезированные лиганды NOD1, представленные препаратами дипептида D-Glu-mDAP (iE-DAP), трипептида L-Ala-D-Glu-L-mDAP (Tri-DAP), трипептида, ковалентно связанного с моносахаридом MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-mDAP (M-Tri-DAP), а также молекула, содержащая, помимо минимальной распознающей последовательности, фрагмент лауриловой кислоты Lauroyl- $\gamma$ -D-Glu-D-mDAP (iE-DAP-C12), приобретены у фирмы Invivo-gen, США (кат. номера: tlrl-dap, tlrl-tdap, tlrl-c12dap). Лиганд TLR4 – ЛПС – приобретен в Sigma-Aldrich, США (кат. номер L3024). Лиганд TLR5 – флагеллин, получен как описано в работе [9]

### Выделение и очистка молекулы GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-mDAP – фрагмента пептидогликана *Neisseria meningitidis* серогруппы В – лиганда NOD1-рецептора

Первичное культивирование *N. meningitidis* (штамм 591 дикого типа, принадлежащий к серогруппе В, выделен в 1985 г. в Москве из спинномозговой жидкости больного менингитом. Фенотип: В : NT : P1.1,2) проводили при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub> на среде Thayer Martin (кат. номер M413, Himedia, Индия). Для придания селективных свойств в среду добавляли набор

антибиотиков V.C.N.T. Supplement (кат. номер FD024, Himedia, Индия) Препаративное наращивание бактерии проводили в бульоне Brain Heart Infusion (кат. номер 211059, Difco, США) при добавлении 10 об.% сыворотки лошади при 37°C в условиях шутелирования (160 качаний/мин).

Выделение и хроматографическую очистку лиганда NOD1-рецептора проводили по ранее опубликованному методу [10], включающему предварительную термическую инактивацию бактерий при 65°C в течение 1 ч, фенол-хлороформную экстракцию при нагревании и перемешивании фенол-водной смеси при 70°C в течение 30 мин. Водную фазу, содержащую фрагменты пептидогликана, подвергали тангенсальной ультрафильтрации (Millipore, США) через фильтр с диаметром пор 30 кДа. Фильтрат очищали тремя последовательными методами обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Bioalliance 2796 (Waters, США). Первые два этапа очистки были выполнены с использованием колонки Symmetry C18 Column, диаметр частиц 5 мкм, 4.6 × 75 мм (Waters, США). На заключительном этапе очистки использовали колонку Synergi Hügro-RP 80 Å, диаметр частиц 4 мкм, 250 × 3 мм (Phenomenex, США).

Хроматографическое разделение веществ проводили с помощью спектрофотометрического детектора 2487 (Waters, США, λ 205, 260 и 280 нм), на завершающем третьем этапе очистки в качестве детектора также использовали масс-спектрометр Q-STAR Elite с ионоспрейными источниками ионизации Turbo Spray и Nano Spray (Applied Biosystems/MDS SCIEX, США). Полученный образец, содержащий масс-спектрометрически чистое вещество, подвергали масс-спектрометрическому анализу с целью определения первичной структуры исследуемой молекулы. На первом этапе анализа определяли точную молекулярную массу вещества, равную 850.353 Да. Затем молекулы изучаемого вещества фрагментировали в ионоспрейном источнике ионизации для последующего определения последовательности аминокислот, входящих в состав молекулы, используя программное обеспечение Protein Pilot (Applied Biosystems, США). Небелковую часть молекулы идентифицировали методом псевдо-МС3 (изучение продуктов вторичной фрагментации ионов, полученных путем предварительного распада исходной анализируемой молекулы в источнике ионизации). Изучение путей распада основных фрагментов иона анализируемой молекулы позволило определить ее итоговую брутто-формулу.

Сравнительный анализ спектров фрагментации различных контрольных веществ (включая N-ацетилглюкозамин) и анализируемого вещества

в идентичных условиях позволил разрешить первичную структуру молекулы: GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-mDAP.

Полученные результаты подтверждали, проводя аналогичную работу на образцах культуральной бактериальной среды (отрицательный контроль), кроме того, после каждого хроматографического этапа очистки измеряли биологическую активность образца, содержащего изучаемое вещество, т.е. его способность активировать NF-κB в клетках по Toll-независимому механизму.

#### Измерение активности β-галактозидазы

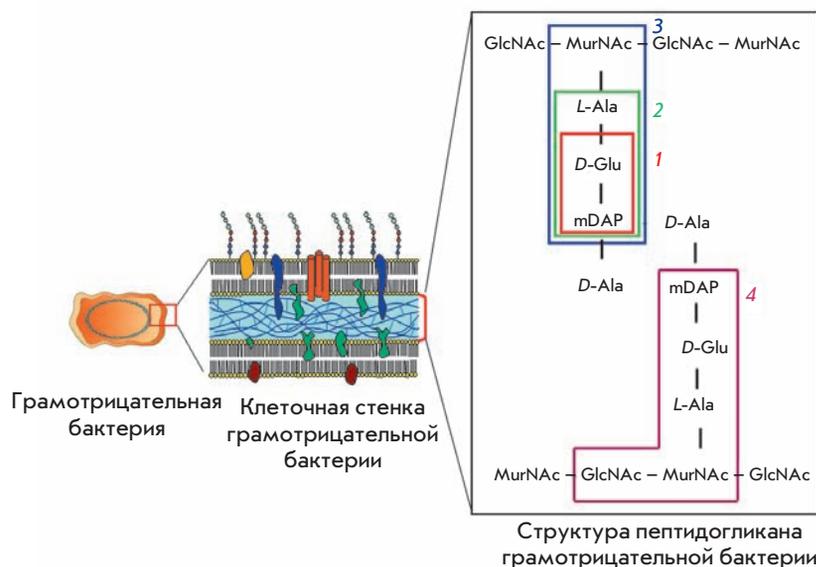
Через 24 ч после добавления исследуемых препаратов к клеткам культуральную среду удаляли и добавляли лизирующий клетки буфер с субстратом для β-галактозидазы (1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.25 M Трис-HCl, pH 7.4; 0.02% NP40; 2 г/л о-нитрофенил-β-D-галактопиранозид (кат. номер 102473, MP Biomedicals, США)). Уровень активности β-галактозидазы определяли спектрофотометрически (414 нм) по превращению субстрата – о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида – в окрашенный продукт о-нитрофенол.

#### Определение интенсивности биолюминесценции в клетках линий НСТ116 и НЕК293, содержащих репортерный ген люциферазы под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого элемента

На предварительном этапе клетки линий НСТ116 и НЕК293 заражали лентивирусным вектором, содержащим репортерный ген люциферазы под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого промотора. За один день до определения биолюминесценции клетки высевали на 96-луночный планшет с конфлюентностью 2 × 10<sup>4</sup> на лунку. На следующий день к клеткам добавляли препараты лигандов PRR, еще через 8 ч – лизирующий буфер, содержащий люциферин Bright-Glo™ Luciferase Assay System (кат. номер E2620, Promega, США). Объем буфера (100 мкл) был равен объему культуральной среды. Уровень активности люциферазы определяли по интенсивности флуоресценции, используя прибор Wallac 1420 plate reader (Perkin Elmer, США).

#### Определение интенсивности биолюминесценции в образцах гомогенатов органов трансгенных мышей линии BalB/C

Трансгенным мышам BalB/C, содержащим ген люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора, вводили внутримышечно лиганды PRR (ЛПС или iE-DAP-C12), и через 1, 3 и 5 ч после этого производили забор органов. Органы гомогенизировали в лизирующем буфере Reporter Lysis 5x Buffer (кат. номер E3971, Promega, США) при добавлении ин-



**Рис. 1.** Лиганды NOD1-рецептора в структуре пептидогликана грамотрицательных бактерий. 1 – *D*-Glu-mDAP (iE-DAP); 2 – *L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (Tri-DAP); 3 – MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (M-Tri-DAP); 4 – GlcNAc-MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (GM-Tri-DAP). GlcNAc – N-ацетилглюкозамин; MurNAc – N-ацетилмурамовая кислота; *L*-Ala – *L*-аланин, *D*-Glu – *D*-глутаминовая кислота; mDAP – *L*-мезо-диаминопимелиновая кислота.

гибиторов клеточных протеаз. Уровень активности фактора транскрипции NF-κB в образцах гомогенатов органов мышей определяли по интенсивности биолюминесценции в нормированных по содержанию белка пробах (10 мг), используя прибор Wallac 1420 plate reader (Perkin Elmer, США).

#### Определение экспрессии NOD1-рецептора методом ОТ-ПЦР

Суммарную РНК из клеток линий НСТ116 и НЕК293 выделяли с использованием реагента Trizol (кат. номер 15596026, Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Для синтеза кДНК использовали набор Superscript III (кат. номер 18080200, Invivogen США). Количество кДНК, кодирующей NOD1-рецептор, нормировали по количеству кДНК *GAPDH*. Выполняли 35 циклов ПЦР с использованием праймеров, специфичных к нуклеотидной последовательности кДНК, кодирующей NOD1 человека – NOD1-forw: ctt-ctg-gtc-act-cac-atc-cgc-a, NOD1-rev: tgg-gca-tag-cac-agc-acg-aac. Температура отжига праймеров 62°C.

#### Измерение интенсивности биолюминесценции в организме трансгенных мышей BalB/C в режиме реального времени

Активность фактора NF-κB в организме трансгенных мышей BalB/C, содержащих в своем геноме репортерный ген люциферазы под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого промотора, измеряли в режиме реального времени по интенсивности биолюминесценции через 1, 3, 5 ч после введения лигандов PRR (ЛПС или iE-DAP-C12). За 5 мин перед не-

посредственным получением изображений мышам вводили по 1.5 мг *D*-люциферина (Caliper Life Sciences). Интенсивность биолюминесценции определяли на приборе IVIS Imaging System 100 (Xenogen Corp., США)

#### Лабораторные животные

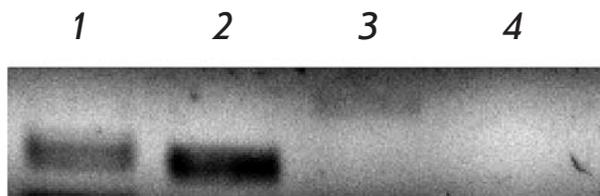
В эксперименте использовали самок трансгенных мышей линии BALB/c-Tg(NFκB-RE-luc[Oslo])-Xen (Caliper Life Sciences, США) весом 18–20 г, содержащих в геноме репортерный ген люциферазы светлячка (из pGL3-Basic Vector, Promega, США) под экспрессионным контролем NF-κB-зависимого промотора, состоящего из трех NF-κB-связывающих участков в промоторе гена легкой цепи Igκ.

Мыши имели свободный доступ к корму и воде. Мышам внутримышечно вводили растворы ЛПС (5 мкг/мышь), а также iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Сравнение NF-κB-активирующей способности лигандов NOD1-рецептора в условиях *in vitro*

Известно, что при разрушении грамотрицательных бактерий и попадании фрагментов пептидогликана внутрь эукариотических клеток ключевой последовательностью, необходимой и достаточной для активации NOD1-рецептора, является дипептид *D*-Glu-mDAP [10]. Участие других аминокислот и моносахаридов, входящих в состав структурных молекул пептидогликана грамотрицательных бактерий, в распознавании NOD1-рецептором остается не до конца выясненным (рис. 1).



**Рис. 2.** Определение экспрессии рецептора NOD1 методом ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров в линии клеток рака прямой кишки человека НСТ116 (1); клетках эпителия эмбриональной почки человека HEK293 (2); клетках немелкоклеточного рака легкого человека H1299 (3); клетках рака легкого человека A549 (4).

В связи с этим представляется важным изучить зависимость NOD1-опосредованной NF-κB-активирующей способности различных фрагментов пептидогликана от их структуры.

С этой целью на предварительном этапе работы для выбора клеточной модели провели скрининговый эксперимент по определению экспрессии NOD1-рецептора различными клеточными линиями. По данным ОТ-ПЦР экспрессия NOD1-рецептора обнаружена в клетках линии HEK293 (эпителий эмбриональной почки человека), а также в клетках рака прямой кишки человека НСТ116. В этой клеточной линии экспрессируется также TLR5 [11], тогда как в клеточных линиях H1299 и A549 экспрессия NOD1-рецептора при выбранных условиях ОТ-ПЦР не детектировалась (рис. 2).

Ввиду того, что клетки линии HEK293 не экспрессируют TLR (присутствие которых может привести к дополнительной активации NF-κB при использовании лигандов NOD1-рецептора, содержащих примеси молекул-лигандов TLR), эта клеточная линия служила моделью для изучения способности лигандов NOD1-рецептора, имеющих различную структуру, активировать NF-κB.

Используя лентивирусный вектор, в геном клеток HEK293 ввели ген репортерного белка β-галактозидазы под транскрипционным контролем NF-κB-зависимого промотора, а также маркер устойчивости к бластицидину S. Принцип использования полученной клеточной линии основан на способности NOD1-рецептора, после взаимодействия его со специфическими лигандами, активировать каскад киназ (RIP2, IKKα,β), в результате чего происходит активация фактора NF-κB с последующей транслокацией его в ядро, где этот фактор связывается с собственным регуляторным элементом, под контролем которого находится ген галактозидазы. Таким обра-

зом, по цветной реакции на галактозидазу можно количественно измерить активность NF-κB в клетках, зарегистрировав взаимодействие NOD1-рецептора с собственными лигандами.

Для измерения активности NF-κB в клетках линии HEK293 добавляли различные по структуре лиганды NOD1-рецептора: дипептид *D*-Glu-mDAP (iE-DAP), трипептид *L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (Tri-DAP), а также трипептид, ковалентно связанный с моносахаридом MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (M-Tri-DAP). Кроме того, в нашей работе использовался трипептид, ковалентно связанный с дисахаридом GlcNAc-MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu-*L*-mDAP (GM-Tri-DAP), полученный из *N. meningitidis* серогруппы В и очищенный до масс-спектрометрической чистоты по ранее описанному методу [10]. Дополнительно использовали химически синтезированную молекулу, содержащую не только минимальную распознающую последовательность, но и фрагмент лауриловой кислоты Lauroyl-γ-*D*-Glu-*D*-mDAP (iE-DAP-C12), меняющий физико-химические свойства данной молекулы.

Как видно из рис. 3, достоверное повышение NF-κB-зависимой активации экспрессии гена β-галактозидазы достигалось лишь при максимальных концентрациях (1–10 мкг/мл) добавляемого дипептида *D*-Glu-mDAP, тогда как производные этого дипептида с большей молекулярной массой, Tri-DAP, M-Tri-DAP и GM-Tri-DAP, встречающиеся в составе пептидогликана грамотрицательных бактерий, вызывали достоверное увеличение NF-κB-зависимой экспрессии гена β-галактозидазы при более низких концентрациях (от 0.5 мкг/мл). Наибольшую NOD1-опосредованную способность активировать NF-κB показала химически синтезированная молекула iE-DAP-C12. Минимальная концентрация данной молекулы, способная вызывать NF-κB-зависимую активацию экспрессии гена β-галактозидазы, равна 20 нг/мл. Такое значительное по сравнению с *D*-Glu-mDAP (около 1000 раз) увеличение NF-κB-активирующей способности можно объяснить присутствием гидрофобной части лауриновой кислоты, которая, по всей видимости, позволяет молекуле iE-DAP-C12 легче проникать через плазматическую мембрану и связываться с NOD1-рецептором, расположенным в цитоплазме клетки.

Таким образом, в ходе данного эксперимента было показано, что увеличение аминокислотной последовательности в структуре лиганда NOD1-рецептора приводит к достоверному увеличению NF-κB-активирующей способности молекулы по сравнению с минимальной последовательностью *D*-Glu-mDAP, активирующей NF-κB, тогда как присутствие остатков моносахаров в составе молекулы лиганда не влияет на дальнейшее увеличение активности.

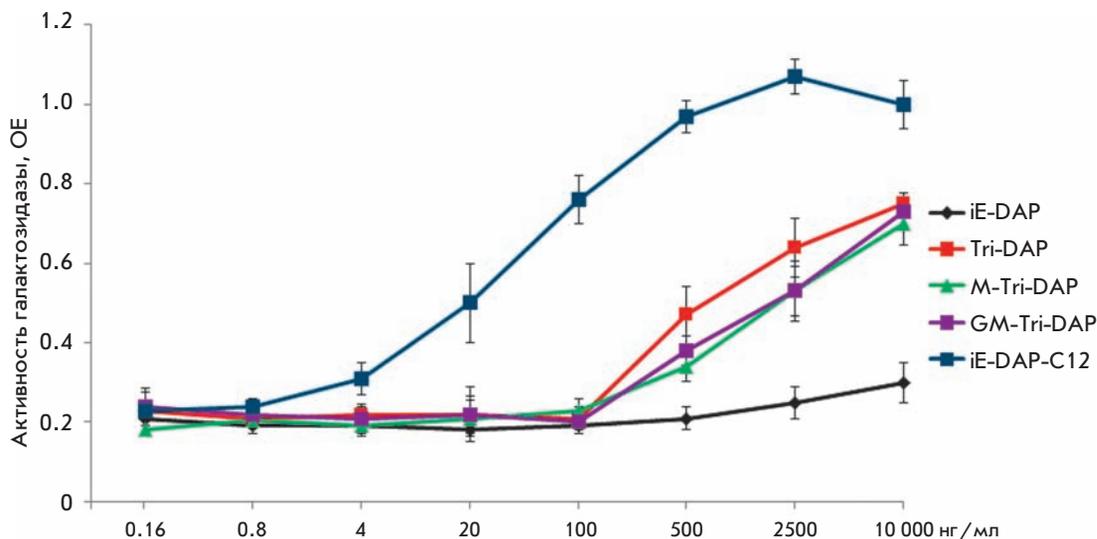


Рис. 3. Измерение активности фактора транскрипции NF-kB в клетках HEK293, экспрессирующих рецептор NOD1. Уровень активности β-галактозидазы определяли спектрофотометрически (λ = 414 нм) по превращению специфического субстрата о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида. По оси абсцисс – концентрация лигандов NOD1-рецептора.

Этот факт можно объяснить тем, что для максимально эффективного распознавания NOD1-рецептором (попадания в «карман» его лиганд-распознающего домена) молекула лиганда должна содержать как минимум три ковалентно связанные аминокислоты, тогда как дополнительно введенные молекулы моносахаридов не участвуют в непосредственном создании лиганд-рецепторного комплекса. Кроме того, NF-kB-активирующая способность лиганда NOD1-рецептора может быть значительно увеличена (примерно в 1000 раз) за счет повышения гидрофобности молекулы в результате присоединения к ней остатка жирной кислоты. Такая модификация, скорее всего, позволяет быстрее обеспечить необходимую концентрацию лиганда вблизи рецептора в цитоплазме за счет облегчения прохождения его через плазматическую мембрану клетки.

Лиганд NOD1-рецептора iE-DAP-C12, показавший наибольшую активность, был выбран для дальнейших исследований.

### Сравнение NF-kB-активирующей способности лигандов NOD1 и TLR5 в клетках рака прямой кишки человека HCT116

Для сравнения NF-kB-активирующей способности лигандов NOD и TLR в условиях *in vitro* в качестве модели выбрали клеточную линию HCT116, экспрессирующую как NOD1-рецептор, так и TLR5, лигандом которого служит белок жгутиков бактерий – флагеллин.

Активность NF-kB измеряли по экспрессии гена люциферазы, введенного в геном клеток под транскрипционным контролем NF-kB-зависимого элемента.

В качестве положительного контроля активации NF-kB использовали TNF-α. Этот цитокин после вза-

имодействия с собственным рецептором стимулирует активацию NF-kB и индуцирует экспрессию провоспалительных факторов.

Результаты опыта показывают (рис. 4), что наиболее активный из лигандов NOD1-рецептора – iE-DAP-C12 – оказывает на NF-kB эффект, сравнимый с эффектом флагеллина, но в концентрациях в 10–100 раз больших, чем флагеллин. По результатам этого опыта можно сделать вывод, что лиганды NOD1-рецептора слабее активируют NF-kB, чем лиганд TLR5, по крайней мере, при использованном пути доставки. Подобный феномен можно объяснить целым рядом причин: необходимостью прохождения лигандами NOD1-рецептора дополнительных барьеров (плазматической мембраны и цитоплазматического пространства), разным сродством TLR и NOD-рецепторов к собственным лигандам, различиями в нижележащих сигнальных каскадах, приводящих к активации фактора транскрипции NF-kB.

Способность лигандов NOD1-рецептора вызывать специфические реакции иммунного ответа при более слабой активации NF-kB в эукариотических клетках, чем TLR, может свидетельствовать о том, что уровень активности NF-kB может определять развитие тех или иных специфических реакций иммунного ответа, а также регулировать их интенсивность.

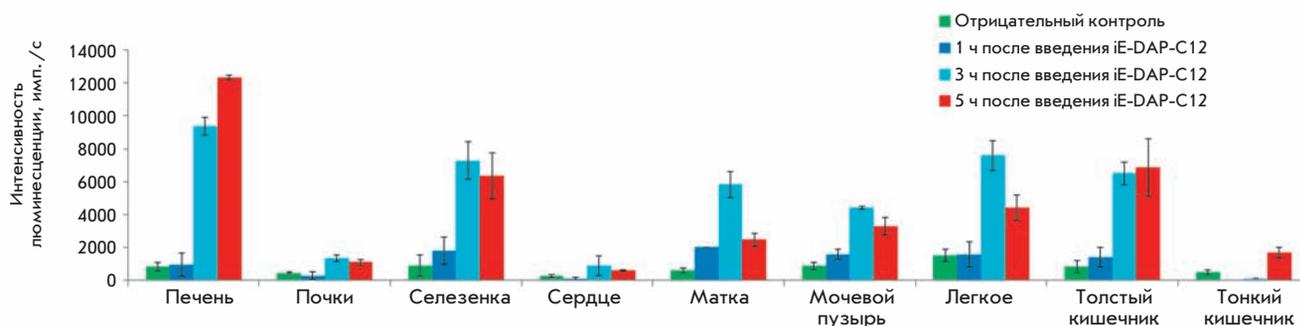
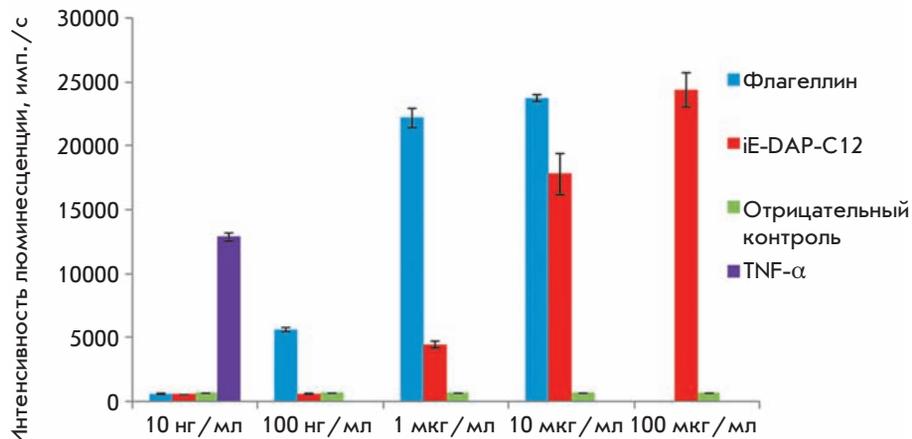
Установленное соотношение концентрации лигандов NOD1 и TLR, активирующих NF-kB, в равной степени было учтено при проведении последующих исследований в условиях *in vivo*.

### Изучение NF-kB-активирующей способности лиганда NOD1-рецептора в условиях *in vivo*

Ранее было показано, что уровень активации NF-kB может отличаться в разных органах лабораторных

**Рис. 4.** Измерение уровня активности фактора транскрипции NF-κB в клетках НСТ116, одновременно экспрессирующих рецепторы NOD1 и TLR5.

■ – клетки, обработанные лигандом Toll-подобного рецептора 5 – флагеллином; ■ – клетки, обработанные лигандом NOD1-рецептора – iE-DAP-C12; ■ – контрольные интактные клетки; ■ – клетки, обработанные TNF-α в концентрации 10 нг/мл. Уровень активности люциферазы определяли спектрофотометрически после добавления специфического субстрата люциферина. По оси абсцисс – концентрация лигандов NOD1- и TLR5-рецепторов.



**Рис. 5.** Измерение уровня активности фактора транскрипции NF-κB в образцах гомогенатов органов мышей через 1, 3, 5 ч после введения лиганда NOD1-рецептора – iE-DAP-C12. Образцы гомогенатов органов были нормированы по содержанию общего белка (10 мг/мл). ■ – активность NF-κB в органах контрольных мышей через 3 ч после введения 100 мкл фосфатного буфера. ■ – активность NF-κB в органах мышей через 1 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). ■ – активность NF-κB в органах мышей через 3 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). ■ – активность NF-κB в органах мышей через 5 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). Уровень активности люциферазы определяли спектрофотометрически после добавления специфического субстрата люциферина.

животных, которым ввели лиганды TLR [12, 13]. Однако на сегодняшний день отсутствуют данные, показывающие способность лигандов других PRR – NOD-рецепторов, вызывать активацию NF-κB в условиях *in vivo*. Мы изучили этот вопрос, определив основные параметры активации (кинетику и интенсивность активации в различных органах) при введении лиганда NOD1-рецептора iE-DAP-C12, показавшего наибольшую активность в опытах *in vitro*. Кроме того, мы сравнили NF-κB-активирующие способности лигандов NOD и TLR4, наиболее полно изученного Toll-подобного рецептора, в условиях *in vivo* при внутримышечном введении.

С этой целью мы использовали трансгенных мышей линии BalB/C, в геном которых встроен репортерный ген люциферазы под контролем NF-κB-

зависимого промотора. Такая система позволяет измерять степень активации NF-κB в различных органах мышей по интенсивности люминесцентного свечения при введении лигандов PRR [14].

Для сравнения параметров активации NF-κB, наблюдаемой при введении iE-DAP-C12, мы выбрали наиболее изученный в условиях *in vivo* лиганд Toll-подобного рецептора 4 – ЛПС [13, 15, 16].

Количества лигандов NOD1 и TLR4 выбирали, исходя из данных о NF-κB-активирующей способности этих лигандов в условиях *in vitro* (200 мкг/мышь и 5 мкг/мышь соответственно).

Показано (рис. 5), что при внутримышечном введении iE-DAP-C12 наибольшая не только относительная, но и абсолютная индукция активации NF-κB (более 12 раз) наблюдается в печени. Кроме того,

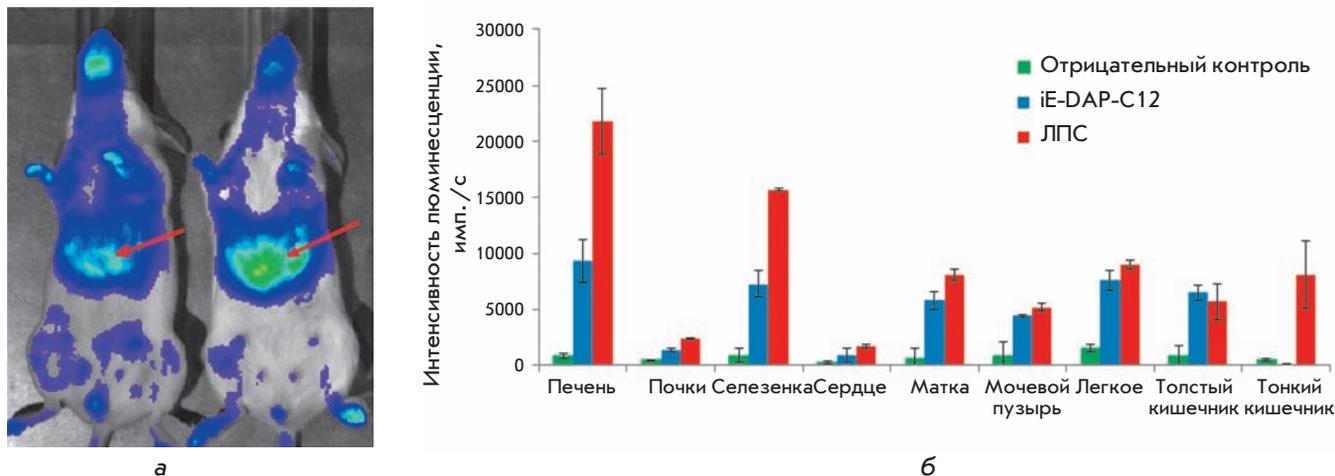


Рис. 6. Измерение уровня активности фактора транскрипции NF- $\kappa$ B в организме мышей после введения лиганда NOD1-рецептора – iE-DAP-C12 (слева) и лиганда Toll-подобного рецептора 4 – липополисахарида (ЛПС) *E. coli* (справа) в режиме реального времени (а) и в образцах гомогенатов органов мышей через 3 ч после введения iE-DAP-C12 и ЛПС *E. coli* (б). Красными стрелками указана наибольшая интенсивность биолоуминесценции, локализованная в печени мышей после введения лигандов PRR. Образцы гомогенатов органов были нормированы по содержанию общего белка (10 мг/мл). ■ – активность NF- $\kappa$ B в органах контрольных мышей через 3 ч после введения 100 мкл фосфатного буфера. ■ – активность NF- $\kappa$ B в органах мышей через 3 ч после введения iE-DAP-C12 (200 мкг/мышь). ■ – активность NF- $\kappa$ B в органах мышей через 3 ч после введения ЛПС *E. coli* (5 мкг/мышь). Уровень активности люциферазы определяли спектрофотометрически после добавления специфического субстрата люциферина.

в печени и тонком кишечнике максимальный уровень активации NF- $\kappa$ B достигается через 5 ч после введения лиганда, тогда как в других органах в этот момент времени наблюдалось снижение уровня активации NF- $\kappa$ B. В трех из 9 органов лабораторных животных (почки, сердце, тонком кишечнике) введение лиганда NOD1 приводило к минимальному увеличению активации NF- $\kappa$ B по сравнению с уровнем активности NF- $\kappa$ B в контрольной группе.

На завершающем этапе мы сравнили уровни активации NF- $\kappa$ B в различных органах мышей, которым внутримышечно ввели iE-DAP-C12 и ЛПС через 3 ч после лигандов (в точке максимальной активации NF- $\kappa$ B).

Как видно из рис. 6а,б, введение ЛПС сильнее активирует NF- $\kappa$ B в ряде органов (печень, селезенка, матка, тонкий кишечник), чем iE-DAP-C12. В толстом кишечнике, легких и мочевом пузыре введение лигандов NOD1 и TLR4 вызывало сравнимые уровни активации NF- $\kappa$ B. В остальных органах (почках и сердце) не наблюдалось достоверного повышения уровня активации NF- $\kappa$ B в ответ на введение как iE-DAP-C12, так и ЛПС.

Таким образом, по результатам изучения способности лигандов NOD1 активировать NF- $\kappa$ B в условиях *in vivo* можно заключить, что интенсивность, а также кинетика активации NF- $\kappa$ B в ответ на введение

этих лигандов различаются в отдельных органах мышей. Кроме того, обнаружены различия в интенсивности активации NF- $\kappa$ B в органах мышей после введения лигандов NOD1 и TLR4 в выбранных концентрациях.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что активация фактора NF- $\kappa$ B, вызванная взаимодействием NOD1-рецептора с собственными лигандами, отличается от активации при стимуляции представителей TLR (кинетика и интенсивность активации) в одном и том же органе, что может быть существенным для развития последующих реакций иммунного ответа. Кроме того, показанная ткане- и органоспецифичность активации NF- $\kappa$ B при введении лигандов Toll- или NOD-рецепторов в организм животного может приводить к развитию различных локальных реакций иммунного ответа в том или ином органе или ткани (например, могут наблюдаться различия в спектре секретируемых цитокинов). Развитие определенных иммунных реакций может объясняться различиями в дифференцировке, а также в типах клеток, представляющих ту или иную ткань, в которых произошла индукция активации NF- $\kappa$ B.

Способность лигандов NOD1-рецептора активировать фактор NF- $\kappa$ B в условиях *in vivo* может использоваться для создания новых молекулярных адъювантов, обладающих меньшей реактогенностью

по сравнению с некоторыми лигандами TLR (например, ЛПС). Такие адъюванты в перспективе могут применяться совместно с вакцинными антигенами для защиты от различных, в том числе внутрикле-

точных, патогенов. Для подтверждения этого предположения необходим детальный анализ отдельных иммунных реакций, инициируемых активацией NOD-рецепторов. ●

---

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Medzhitov R., Janeway C. Jr. // *Trends Microbiol.* 2000. V. 10. P. 3452–3456.
2. Kishore U. *Target Pattern Recognition in Innate Immunity.* Springer Science +Business Media, LLC Landes Bioscience, 2009. 202 p.
3. Hayden M.S., West A.P., Ghosh S. // *Oncogene.* 2006. V. 51. P. 6758–6780.
4. Carmody R.J., Chen Y.H. // *Cell. Mol. Immunol.* 2007. V. 1. P. 31–41.
5. Gill N., Davies E.J., Ashkar A.A. // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2008. V. 59. P. 35–43.
6. Borsutzky S., Kretschmer K., Becker P.D., Mühlradt P.F., Kirschning C.J., Weiss S., Guzmán C.A. // *J. Immunol.* 2005. V. 174. P. 6308–6313.
7. Weeratna R.D., Makinen S.R., McCluskie M.J., Davis H.L. // *Vaccine.* 2005. V. 45. P. 5263–5270.
8. Warren S.E., Mao D.P., Rodriguez A.E., Miao E.A., Aderem A. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. P. 7558–7564.
9. Burdelya L.G., Krivokrysenko V.I., Tallant T.C., Strom E., Gleiberman A.S., Gupta D., Kurnasov O.V., Fort F.L., Osterman A.L., Didonato J.A., et al. // *Science.* 2008. V. 5873. P. 226–230.
10. Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro L.A., Antignac A., Jéhanno M., Viala J., Tedin K., Taha M.K., Labigne A., Zähringer U., et al. // *Science.* 2003. V. 5625. P. 1584–1587.
11. Zhao L., Kwon M.J., Huang S., Lee J.Y., Fukase K., Inohara N., Hwang D.H. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 11618–11628.
12. Alexander G., Carlsen H., Blomhoff R. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003. V. 44. P. 2683–2688.
13. Carlsen H., Moskaug J.O., Fromm S.H., Blomhoff R. // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 1441–1446.
14. Ho T.Y., Chen Y.S., Hsiang C.Y. // *Biomaterials.* 2007. V. 30. P. 4370–4377.
15. Austenaa L.M., Carlsen H., Hollung K., Blomhoff H.K., Blomhoff R. // *J. Nutr. Biochem.* 2009. V. 20. P. 726–734.
16. Pruett S.B., Fan R. // *BMC Immunol.* 2009. Doi 10.1186/1471-2172-10-49.