

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Корнеев Кирилл Викторович

**Структурно-функциональные особенности активации TLR4
на миелоидных клетках мыши *in vitro* и в модели
острой гепатотоксичности**

03.03.03 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научный руководитель

Купраш Дмитрий Владимирович

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, профессор кафедры иммунологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты

Сергеева Марина Глебовна

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник отдела биокинетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Бигильдеев Алексей Евгеньевич

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения России

Пичугин Алексей Васильевич

кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории активации иммунитета ФГБУ «Государственный научный центр Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «26» ноября 2018 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. ББА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/151039497/>

Автореферат разослан 25 октября 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Все многоклеточные организмы столкнулись с необходимостью развить иммунную систему, распознающую патогенов и способную адекватно ответить на них (Beutler et al., 2004). У позвоночных клетки врожденного иммунитета стали ключевой системой защиты от патогенов, поскольку они способны распознать их и быстро запустить иммунный ответ, что приводит к активации адаптивного иммунитета и формированию клеток памяти (Joffre et al., 2009). Одним из важнейших компонентов иммунной системы являются паттерн-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, среди которых выделяют семейство Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR встречаются почти у всех групп сложно устроенных организмов – от двукрылых насекомых до позвоночных животных (Nie et al., 2018). У млекопитающих охарактеризовано как минимум 13 различных TLR (Takeda, Akira, 2015). Название этих рецепторов произошло от Toll-рецептора (структурного гомолога) дрозофил, чей ген оказался ответственным за развитие в эмбриогенезе (Anderson et al., 1985). Позже было установлено, что нарушения в передаче сигнала этого рецептора у имаго приводили к снижению синтеза противогрибкового пептида дрозомидина, что способствовало возникновению грибковых инфекций (Lemaitre et al., 1996). Вскоре у человека был открыт первый рецептор, гомологичный Toll-рецепторам дрозофилы (Medzhitov et al., 1997) – Toll-подобный рецептор 4 (TLR4), а также охарактеризован его природный лиганд – липополисахарид (ЛПС) (Poltorak et al., 1998), являющийся компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Эти работы по изучению активации врожденного иммунитета привели Брюса Бойтлера и Жюля Хоффмана к Нобелевской премии 2011 г.

Среди рецепторов врожденного иммунитета TLR4 имеет одну из наиболее сложных систем внеклеточной и внутриклеточной передачи сигналов – нетривиальное связывание с лигандом, дивергенция внутриклеточных сигнальных путей, локализация в плазматической мембране или эндосоме. TLR4 играет важную роль в развитии септического шока, опухолевых и аутоиммунных патологий, а также вторичных бактериальных инфекций (Leon et al., 2008; Chen et al., 2016; Свириева и соавт., 2016; Korneev et al., 2017). На данный момент наиболее изученными лигандами TLR4 являются высокоактивный гексаацилированный липид А из *Escherichia coli* и его низкоактивный тетраацилированный биосинтетический предшественник – липид IVa (Ohto et al., 2012), однако природное многообразие вариантов ЛПС не ограничивается уже изученными. Интересным представляется изучение биоактивности неканонических ЛПС, в первую очередь гетерогенных по структуре липида А – домена, непосредственно взаимодействующего с TLR4 сигнальным комплексом. Большое клиническое значение имеет исследование механизмов взаимодействия высокопатогенных бактерий, таких как чумная палочка *Yersinia pestis*, с иммунной системой человека. Также актуальным представляется изучение потенциально патогенных бактерий, с которыми современный человек никогда прежде не контактировал, например, древних психробактерий из вечной мерзлоты.

Изучение особенностей активации TLR4 сигнального пути может способствовать прогрессу в лечении различных патологий. Рассматривают применение антагонистов TLR4 шаперонина 10 (HSP10), пентаацилированного ЛПС из *Bartonella quintana* и TLR4-блокирующего антитела NI-0101 для терапии аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита (Vanags et al., 2006; van Eden, 2008; Monnet et al., 2017; Abdollahi-Roodsaz et al., 2007), а препарат Eritoran и низкомолекулярный ингибитор TAK-242 изучают в качестве блокаторов сигнального пути TLR4 для терапии септического шока (Rice et al., 2010; Barochia et al., 2011). В то же время агонисты TLR4 (BCG, ОК-432) используются в терапии некоторых онкологических заболеваний, например, при раке мочевого пузыря (Korneev et al., 2017). Интересно отметить, что в клинической практике низкий уровень распознавания ЛПС организмом означает снижение вероятности возникновения сепсиса у пациентов, в то время как на уровне человеческой популяции низкий уровень распознавания ЛПС может привести к широкому распространению инфекций вследствие невозможности полноценной активации системы врожденного иммунитета через TLR4. В работе рассмотрены структурно-функциональные аспекты взаимодействия TLR4 с ЛПС из различных грамотрицательных бактерий, а также изучена роль TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в мышинной модели острой гепатотоксичности.

Целью работы являлось изучение закономерностей активации рецептора врожденного иммунитета TLR4 в зависимости от строения его лиганда – ЛПС, а также определение вклада TLR4 в патогенез септического шока на примере развития острой гепатотоксичности у мышей.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи** по изучению ЛПС из различных штаммов грамотрицательных бактерий:

- 1) Оценить специфичность передачи сигнала через TLR4, а также степень активации MyD88-зависимого и MyD88-независимого сигнальных путей.
- 2) Определить влияние количества и размера ацильных групп в составе липида А на биологическую активность ЛПС.
- 3) Изучить влияние гликозилированных фосфатных групп липида А и заряженных аминокислотных остатков TLR4 на эффективность активации макрофагов мыши в культуре.
- 4) Охарактеризовать роль TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в мышинной модели острой гепатотоксичности.

Научная новизна работы

Впервые была определена биологическая активность ЛПС из патогенных штаммов грамотрицательных бактерий: возбудителя госпитальных инфекций *Acinetobacter baumannii* 1053, возбудителя гастроэнтерита *Campylobacter jejuni* O2A, возбудителя сапа *Burkholderia mallei* C-5, синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* 2192, чумной палочки *Yersinia pestis* KM260(11) дикого типа и ее мутантов по генам, ответственным за присоединение к липиду А различных структурно-функциональных групп, а также ЛПС из древних психротрофных бактерий *Psychrobacter arcticus* DSM 17307T и

P. cryohalolentis DSM 17306T. Впервые произведен сравнительный анализ их биоактивности. На примере ЛПС из этих штаммов бактерий показано, что количество ацильных цепей в составе липида А сильнее влияет на биоактивность ЛПС из изученных штаммов бактерий, чем их длина, и что экранирование отрицательного заряда фосфатных групп липида А снижает биоактивность ЛПС.

В работе впервые охарактеризован вклад TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в развитие у мышей острой гепатотоксичности, индуцированной введением ЛПС и D-Галактозамина. Установлено, что TNF является основным фактором патогенности и приводит к гибели мышей с делецией TLR4 в миелоидных клетках в этой модели, причем TNF также может функционировать в качестве промежуточного активатора миелоидных клеток с делецией TLR4.

Теоретическая и практическая значимость работы

Представленные в диссертационной работе результаты имеют самостоятельный интерес не только для фундаментальных знаний в области функционирования рецепторов врожденного иммунитета как медиаторов антибактериального иммунного ответа и патологических состояний, но и для практического применения.

В работе рассмотрены особенности взаимодействия TLR4 сигнального комплекса с ацильными и фосфатными группами в составе ЛПС из различных бактерий. Понимание влияния микрорегетерогенности структурных компонентов ЛПС на активацию иммунного ответа необходимо для определения механизма его тонкой настройки, а также поиска новых подходов к иммуномодулирующим процессам. Полученные результаты могут быть использованы для предсказания биоактивности ЛПС исходя из его строения, а также для разработки терапевтических блокаторов TLR4 для возможного применения при септическом шоке. Детальное понимание особенностей активации TLR4 может способствовать развитию более эффективных подходов к лечению опухолевых и аутоиммунных заболеваний, ассоциированных с хроническим воспалением.

Полученные данные о роли TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в патогенезе острой гепатотоксичности могут быть использованы в дальнейших исследованиях для выявления и изучения клеточных субпопуляций, ответственных за инициацию продукции «патогенного» TNF такими миелоидными клетками. Изучение роли сигнального пути TLR4 в мышинной модели острой гепатотоксичности способствует пониманию механизмов, лежащих в основе септического шока, фульминантного гепатита, острой печеночной недостаточности и других системных острых воспалительных процессов, а также открывает перспективы для разработки новых методов терапевтического вмешательства при подобных патологиях.

Полученные в работе данные могут быть использованы при составлении курса лекций по изучению системы врожденного иммунитета млекопитающих для подготовки студентов по специальности иммунология.

Методология и методы исследования

Определение биологической активности образцов ЛПС и проверку специфичности передачи сигнала проводили на культурах макрофагов костномозгового происхождения,

выделенных из мышей дикого типа и мышей с дефицитом TLR4, оценивая изменение экспрессии основных провоспалительных цитокинов методами количественного ПЦР в реальном времени и иммуноферментного анализа, а также с использованием NFκB-зависимых люциферазных репортеров. Для оценки вклада MyD88-зависимого и MyD88-независимого сигнальных путей в передачу сигнала от TLR4 были использованы костномозговые макрофаги, выделенные из мышей с дефицитом MyD88, а также мышьяная макрофагальная линия RAW264.7 с подавленной экспрессией IRF3 при помощи специфических коротких интерферирующих РНК.

Для определения роли TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в модели острой гепатотоксичности использовали мышей с полным нокаутом TLR4, а также мышей с тканеспецифической делецией TLR4, TNF-RI и двойной делецией TLR4-TNF-RI в миелоидных клетках. В качестве контроля дикого типа использовали мышей из одного помета с «флоксированным» геном, но без экспрессии Cre-делитора (литтермейт-контроль). Моделирование острой токсичности осуществляли путем внутрибрюшинного введения мышам ЛПС и D-Галактозамина, после чего следили за их выживаемостью. Для определения роли TNF в патогенезе гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Гал, мышам вводили блокирующие TNF антитела. Для характеристики тяжести протекания септического шока, у мышей измеряли продукцию провоспалительных цитокинов и активность ферментов трансаминаз в сыворотке крови.

Приведенные в работе данные по экспрессии различных провоспалительных медиаторов были воспроизведены в трех и более независимых экспериментах и представлены в виде средних значений со стандартными отклонениями. Каждая экспериментальная группа состояла не менее чем из пяти мышей. Используемые в работе методы исследования, проведенные расчеты и статистическая обработка данных являются общепризнанными и корректными, что позволяет говорить о достоверности представленных научных результатов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ЛПС из различных бактерий специфически взаимодействуют с сигнальным комплексом TLR4, что приводит к активации как MyD88-зависимого, так и MyD88-независимого сигнальных путей.
2. Биологическая активность ЛПС возрастает с увеличением степени ацилированности липида А и определяется преимущественно количеством ацильных групп, а не их длиной.
3. Положительно заряженные аминокислотные остатки TLR4 способствуют его взаимодействию с ЛПС при наличии неэкранированных фосфатных групп липида А.
4. В мышьяной модели острой гепатотоксичности, индуцируемой ЛПС/D-Гал, миелоидные клетки могут получать ЛПС-TLR4 стимул к продукции патогенного TNF не только напрямую, но и от других клеток, частично при помощи рецептора TNF типа I.

Апробация результатов и публикации

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и отечественных конференциях и научных школах: EFIS-EJI Ruggero

Cerpellini Advanced School of Immunology, Неаполь, Италия, 12-14 октября 2016; V Съезд биохимиков России, Сочи, Россия, 4-9 октября 2016; 40th FEBS Congress, Берлин, Германия, 4-9 июля 2015; 11th Spring School on Immunology, Этгаль, Германия, 8-13 марта 2015; XV Всероссийская молодежная научная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, Владивосток, Россия, 5-15 сентября 2014. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI, а также 6 тезисов конференций.

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены автором или при его участии. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций, написании текста диссертации. Имена соавторов обозначены в тексте работы и указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 198 источников. Работа изложена на 107 страницах, содержит 31 рисунок и 3 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая часть работы была посвящена взаимосвязи между структурой различных вариантов липида А грамотрицательных бактерий и биоактивностью ЛПС в качестве лиганда TLR4. В качестве клеточной модели использовали макрофаги мыши, выращенные в культуре из клеток-предшественников в костном мозге. В сотрудничестве с лабораторией химии углеводов Института органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН (заведующий – проф. Ю.А. Книрель) была изучена биоактивность ЛПС из патогенного штамма чумной палочки *Yersinia pestis* дикого типа и ее мутантов по генам, ответственным за присоединение к липиду А различных структурно-функциональных групп, ЛПС двух представителей древних психротрофных бактерий рода *Psychrobacter*, ЛПС из патогенных штаммов бактерий: возбудителя госпитальных инфекций *Acinetobacter baumannii*, возбудителя гастроэнтерита *Campylobacter jejuni*, возбудителя сапа *Burkholderia mallei* и синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*. Было изучено влияние степени ацилированности липида А, а также гликозилирования фосфатных групп на биологическую активность ЛПС.

Во второй части работы была исследована роль TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в мышинной модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Галактозамином (D-Гал). В сотрудничестве с лабораторией молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (заведующий – акад. С.А. Недоспасов) данная модельная патология была исследована у мышей с полным нокаутом TLR4, а также у мышей с

тканеспецифической делецией TLR4, TNF-RI и двойной делецией TLR4-TNF-RI в миелоидных клетках. Известно, что в модели ЛПС/D-Гал токсичности основными продуцентами «патогенного» TNF являются миелоидные клетки, однако оказалось, что мыши с дефицитом TLR4 в миелоидных клетках не выживают в этой модели, что свидетельствует о функциональном TNF сигнале. Поэтому также была изучена опосредованная активация продукции «патогенного» TNF миелоидными клетками в M-TLR4 дефицитных мышах.

1. Структурно-функциональные особенности активации мышинного TLR4 различными ЛПС из грамотрицательных бактерий

1.1. Проверка специфичности передачи сигнала изучаемыми образцами ЛПС

Сравнительную оценку биоактивности различных ЛПС проводили на культуре мышинных костномозговых макрофагов, полученных из C57Bl/6 мышей (дикого типа), оценивая изменение экспрессии провоспалительных цитокинов методами иммуноферментного анализа и количественного ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени, а также оценивая активацию TLR4 сигналинга с использованием NFκB-зависимых репортерных конструкторов. В качестве положительного контроля использовали высокоактивный ЛПС, выделенный из *E. coli* O130 с бифосфорилированным и гексаацильным липидом А (Перепелов и соавт., 2007), в качестве отрицательного контроля – неактивный ЛПС из *F. tularensis* 15 с монофосфорилированным и тетраацильным липидом А (Мокриевич и соавт., 2010). Для подбора оптимальной концентрации ЛПС костномозговые макрофаги активировали различными ЛПС в диапазоне концентраций от 100 пг/мл до 100 нг/мл. Продукция провоспалительных цитокинов в ответ на стимуляцию макрофагов ЛПС в концентрации 10 нг/мл последовательно различалась между различными образцами ЛПС, поэтому ее использовали в последующих экспериментах. В культуре костномозговых макрофагов, полученных из *Tlr4*-дефицитных мышей, TNF не продуцировался в ответ на изучаемые ЛПС, что свидетельствует о специфичности взаимодействия TLR4 с ЛПС.

Для оценки вклада MyD88-независимого сигнального пути в передачу сигнала от TLR4 была проведена оценка уровня экспрессии интерферон-индуцируемых провоспалительных хемокинов RANTES и IP-10, экспрессирующихся в результате активации TLR4-TRIF-IRF3 сигнального пути (Lin et al., 1999; Kawai et al., 2001). Для этого костномозговые макрофаги, выделенные из WT, а также мышей с делецией TLR4 и MyD88 во всех клетках (TLR4^{-/-} и MyD88^{-/-}), активировали ЛПС (10 нг/мл) с различающимися биоактивностями, затем определяли экспрессию мРНК хемокинов RANTES и IP-10, а также цитокина TNF (рис. 1). MyD88^{-/-} мыши были охарактеризованы ранее (Kleinridders et al., 2009). В результате было показано, что обработка WT и MyD88^{-/-} макрофагов активными ЛПС из *E. coli* и *C. jejuni* приводила к повышению экспрессии мРНК MyD88-независимых хемокинов RANTES и IP-10, в то время как экспрессия мРНК MyD88-зависимого цитокина TNF не увеличивалась. В TLR4^{-/-} макрофагах экспрессия этих цитокинов также не индуцировалась.

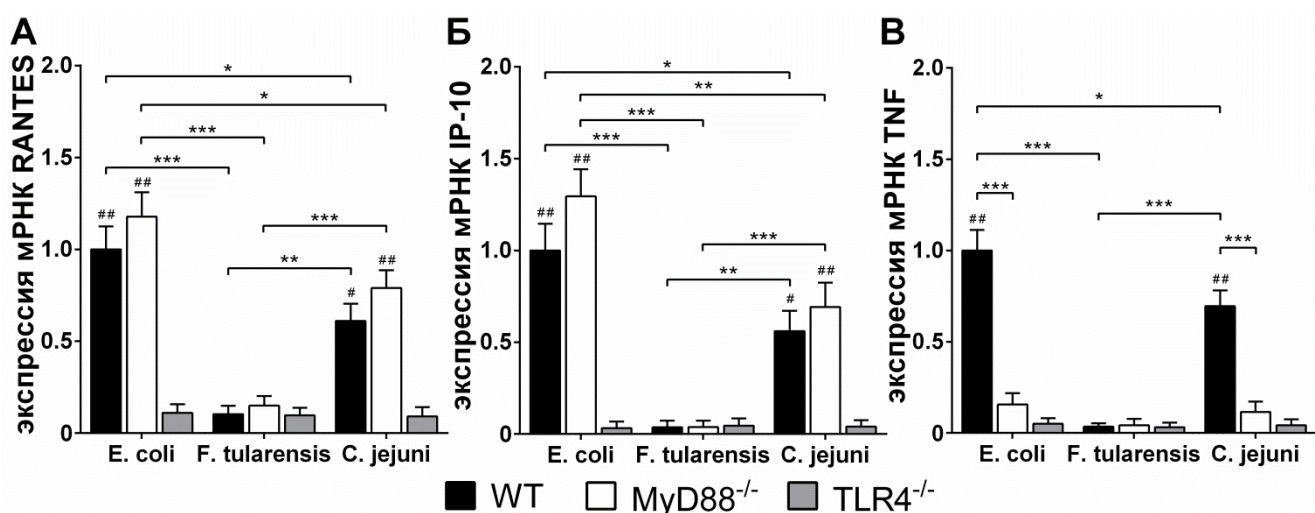


Рис. 1. Активация MyD88-дефицитных макрофагов с помощью ЛПС приводит к увеличению экспрессии провоспалительных хемокинов RANTES и IP-10, но не TNF. Определение уровней экспрессии мРНК RANTES (А), IP-10 (Б) и TNF (В) в костномозговых макрофагах, изолированных из MyD88^{-/-}, TLR4^{-/-} и WT мышей. Относительные уровни экспрессии мРНК нормализованы на экспрессию β-актина. Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены в виде средних значений ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (ANOVA с пост-тестом Tukey). #P < 0.01 и ##P < 0.001 означают значимое отличие биоактивности ЛПС в WT или MyD88^{-/-} макрофагах от активности ЛПС в TLR4^{-/-} макрофагах.

Для подтверждения отсутствия пересечения сигнальных путей от TLR4, было осуществлено подавление экспрессии IRF3 в мышинной макрофагальной линии RAW264.7 с использованием специфических коротких интерферирующих РНК (siRNA) против гена *Irf3*. Вместо макрофагов костномозгового происхождения использовали клеточную линию RAW264.7, поскольку она проще подвергается многократной эффективной трансфекции для осуществления нокдауна. Макрофаги с IRF3 нокдауном в ответ на различные ЛПС продуцировали меньшее количество мРНК хемокинов RANTES и IP-10, в то время как уровень TNF оставался неизменным (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют о том, что биологический эффект активации TLR4 изученными ЛПС будет определяться запуском как MyD88-зависимого, так и MyD88-независимого сигнальных путей.

1.2. Биологическая активность ЛПС повышается с увеличением степени ацилированности липида А

Из литературных источников известно, что степень распознавания ЛПС сигнальным комплексом TLR4/MD-2 определяется в первую очередь взаимодействиями ацильных групп липида А с гидрофобным карманом из двух антипараллельных β-слоев адаптерного белка MD-2 и с неполярными аминокислотными остатками TLR4 (Park et al., 2009). Для определения влияния числа ацильных групп в составе липида А и их длины на биоактивность ЛПС были исследованы отличающиеся по уровню ацилированности ЛПС, выделенные из ранее неохарактеризованных патогенных штаммов грамотрицательных бактерий: возбудителя гастроэнтерита *Campylobacter*

jejuni O2A, возбудителя сапа *Burkholderia mallei* C-5, возбудителя госпитальных инфекций *Acinetobacter baumannii* 1053 и синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* 2192 (Korneev et al., 2015; Korneev et al., 2018). Также нами была изучена биоактивность ЛПС, выделенных из аттенуированного штамма чумной палочки *Yersinia pestis* KM260(11) и его вариантов с мутированными генами *lpxP* и *lpxM*, кодирующих пальмитолеил(16:1)-трансферазу LpxP и лауроил(12:0)-трансферазу LpxM, соответственно, химическое строение которых было установлено ранее (Дентовская и соавт., 2011). Дополнительно была охарактеризована биологическая активность ЛПС из психротрофных бактерий рода *Psychrobacter* spp.

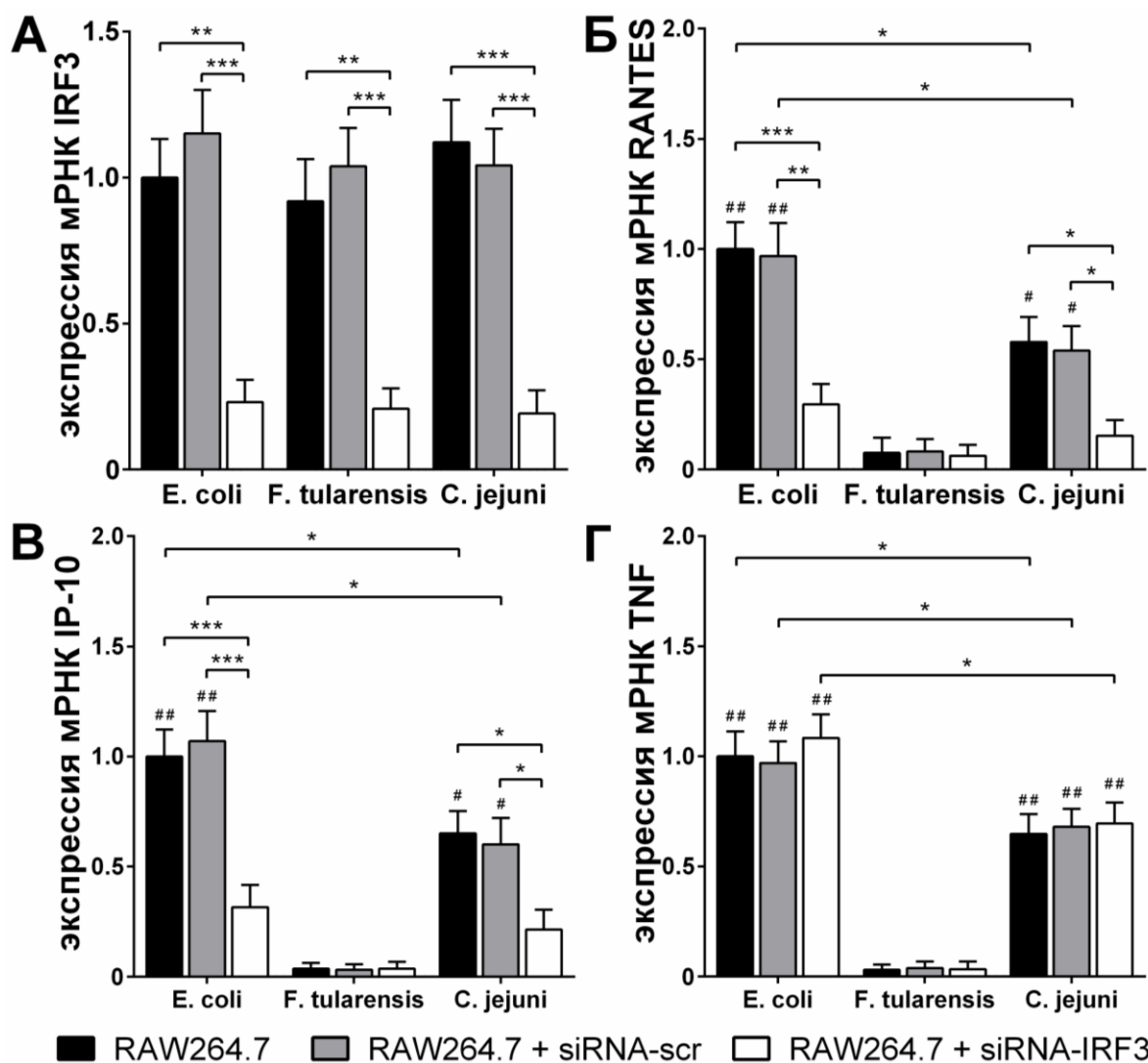


Рис. 2. IRF3-нокдаун приводит к сниженной экспрессии хемокинов RANTES и IP-10 после активации RAW264.7 макрофагов с помощью ЛПС. Определение уровней мРНК IRF3 (А), RANTES (Б), IP-10 (В) и TNF (Г) в RAW264.7 клетках, активированных ЛПС, после подавления экспрессии IRF3 с использованием малых интерферирующих РНК. Экспрессия мРНК нормализована на экспрессию β-актина. Данные получены в пяти независимых экспериментах и представлены в виде средних значений ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (ANOVA с пост-тестом Tukey). #P < 0.01 и ##P < 0.001 означают значимое отличие биоактивности ЛПС из *E. coli* или *C. jejuni* от биоактивности ЛПС из *F. tularensis*.

Вышеописанными образцами ЛПС из различных патогенных штаммов грамотрицательных бактерий активировали макрофаги костномозгового происхождения из мышей дикого типа, после чего измеряли экспрессию мРНК основных провоспалительных цитокинов TNF, IL-6 и IL-1 β , а также их продукцию костномозговыми макрофагами (рис. 3).

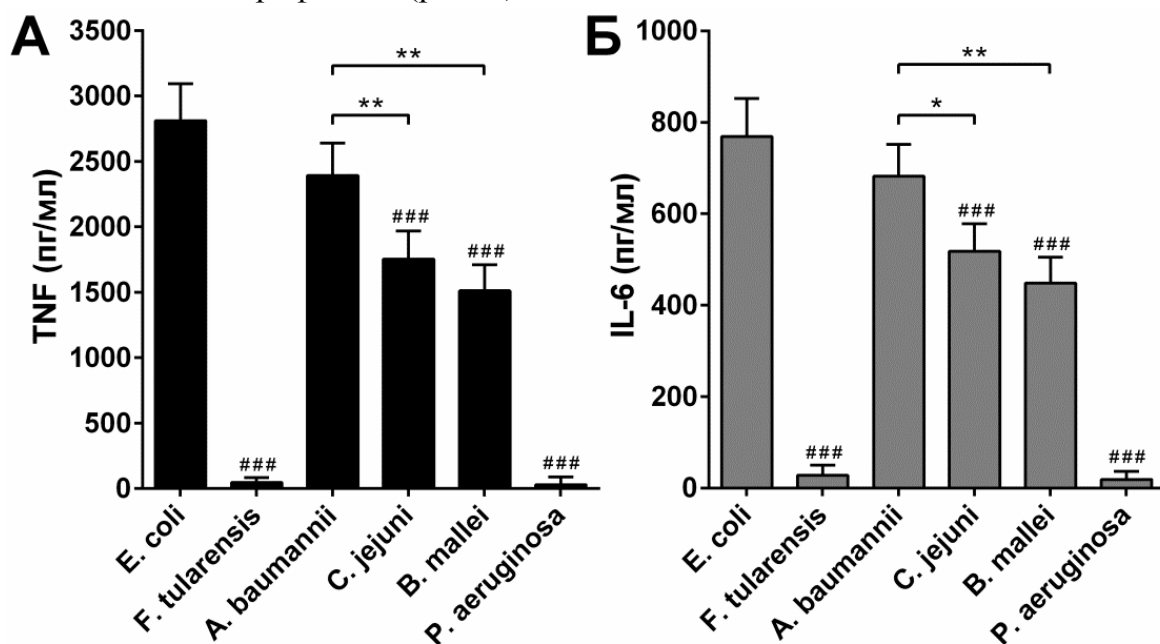


Рис. 3. ЛПС с менее ацилированными липидами А слабее индуцируют продукцию TNF (А) и IL-6 (Б) костномозговыми макрофагами по сравнению с более ацилированными ЛПС. Данные получены в пяти независимых экспериментах и представлены в виде средних значений \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (ANOVA с пост-тестом Tukey). ### $P < 0.001$ – статистически значимое отличие в продукции провоспалительных цитокинов после активации макрофагов ЛПС из различных бактерий по сравнению с ЛПС из *E. coli*.

С целью более подробного изучения влияния транскрипционных эффектов от различных образцов ЛПС на сигнальный путь TLR4, были использованы два NF κ B-репортерных конструкта. Ген люциферазы в первом из них находился под контролем синтетического NF κ B-зависимого промотора (Mitkin et al., 2015), а во втором под контролем мышинового IL-6 промотора, который содержит сайт связывания NF κ B, критический для активности всего промотора (Вассам et al., 2003). Как и в случае с IRF3-нокдауном, для этого вместо костномозговых макрофагов использовали мышиную макрофагальную клеточную линию RAW264.7, поскольку она проще подвергается эффективной трансфекции. Эксперимент качественно воспроизвел профили биоактивности ЛПС, полученные при анализе продукции провоспалительных цитокинов (рис. 4).

Поскольку при определении биологической активности ЛПС путем измерения экспрессии основных провоспалительных цитокинов на уровне мРНК, белка, а также с использованием NF κ B-репортерных конструктов были получены качественно сходные результаты, то при определении биоактивности других ЛПС измеряли только продукцию TNF.

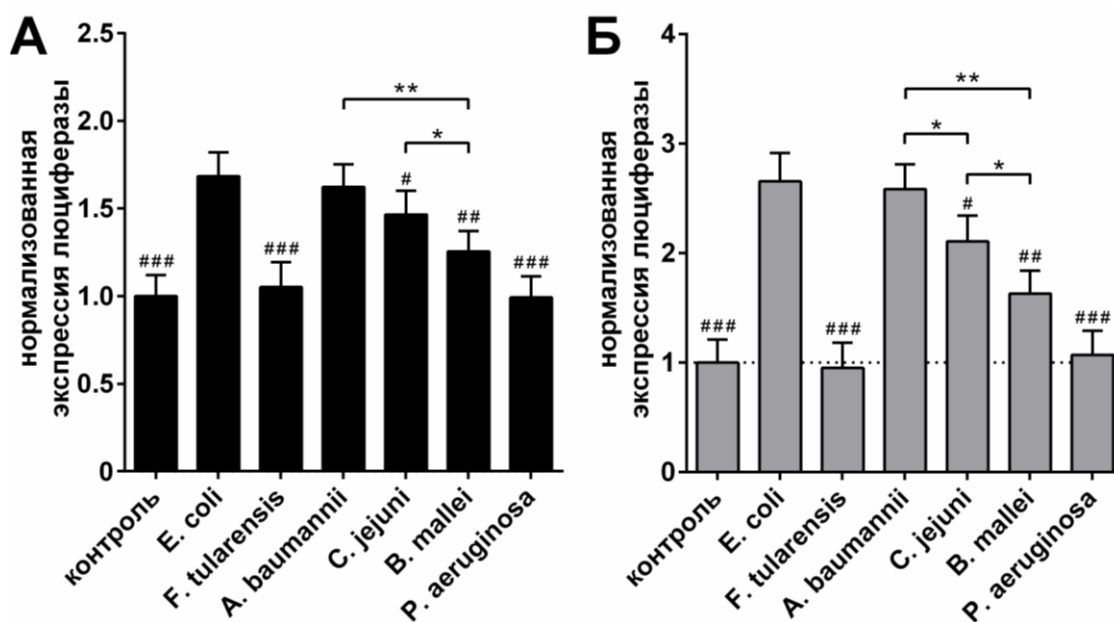


Рис. 4. Высокоацилированные ЛПС индуцируют более сильный уровень экспрессии NFκB (А) и IL-6 (Б) зависимых репортерных конструкций в RAW264.7 макрофагах, чем ЛПС с менее ацилированными липидами А. Контрольная группа была трансфицирована репортерными конструктами без активации ЛПС. Данные получены в пяти независимых экспериментах и представлены в виде средних значений ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01 (ANOVA с пост-тестом Tukey). #P < 0.05, ##P < 0.01 и ###P < 0.001 – статистически значимое отличие в уровне экспрессии люциферазы после активации макрофагов ЛПС из различных бактерий по сравнению с ЛПС из *E. coli*.

ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) дикого типа (WT) в составе липида А имеет шесть ацильных цепей, из которых четыре присоединены непосредственно к двум бисфосфорилированным остаткам глюкозамина и являются первичными, а лауроильная группа (C12:0) и пальмитолеоильная группа (C16:1) – вторичными. Липиды А мутантных вариантов *Y. pestis* KM260(11) ΔlpxM и ΔlpxP лишены вторичной C12:0 или C16:1 цепи, соответственно, и являются пентаацильными. У двойного мутанта *Y. pestis* KM260(11) ΔlpxM/ΔlpxP отсутствуют обе вторичные ацильные цепи, вследствие чего он является тетраацильным. ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) дикого типа, как и ЛПС из *E. coli*, вызывал сильную продукцию TNF, что согласуется с присутствием в этих вариантах ЛПС активного гексаацильного липида А (рис. 5). ЛПС из ΔlpxM и ΔlpxP мутантных штаммов *Y. pestis* KM260(11) слабее индуцировали продукцию TNF, чем штамм дикого типа, свидетельствуя о том, что отсутствие хотя бы одной ацильной цепи является критическим для взаимодействия ЛПС с комплексом TLR4/MD-2. Двойной ΔlpxM/ΔlpxP мутантный штамм *Y. pestis* KM260(11) слабее остальных активировал продукцию TNF в костномозговых макрофагах, что также подтверждает прямую зависимость биологической активности ЛПС от числа ацильных цепей в составе липида А.

P. cryohalolentis DSM 17306T имеет преимущественно гексаацилированный липид А с двумя бисфосфорилированными остатками глюкозамина, к которым присоединены четыре первичные ацильные цепи, а также две вторичные негидроксилированные группы C10, в то время как ЛПС из *P. arcticus* DSM 17307T содержит также

тетраацилированную форму липида А, лишенную одной вторичной цепи С10 и одного первичного остатка ЗНОС12 (Корнеев и соавт., 2014). При сравнении биоактивности ЛПС из штаммов *Psychrobacter* spp., было обнаружено, что продукцию TNF сильнее активировал ЛПС из *P. cryohalolentis*, в котором преобладает гексаацильная форма липида А. ЛПС из *P. arcticus* обладал меньшей биоактивностью, что коррелирует с увеличенным содержанием тетраацильной формы. Более низкий уровень биоактивности гексаацилированного ЛПС из *P. cryohalolentis* по сравнению с гексаацилированными ЛПС из *Y. pestis* и *E. coli* можно объяснить в среднем более короткими ацильными группами в составе липида А: С10-С12 против С12-С16 соответственно. По всей видимости, более короткие остатки жирных кислот липида А обеспечивают менее эффективное взаимодействие молекулы ЛПС с гидрофобным карманом MD-2 и TLR4, следовательно хуже происходит активация рецептора и уровень продукции провоспалительных цитокинов снижается.

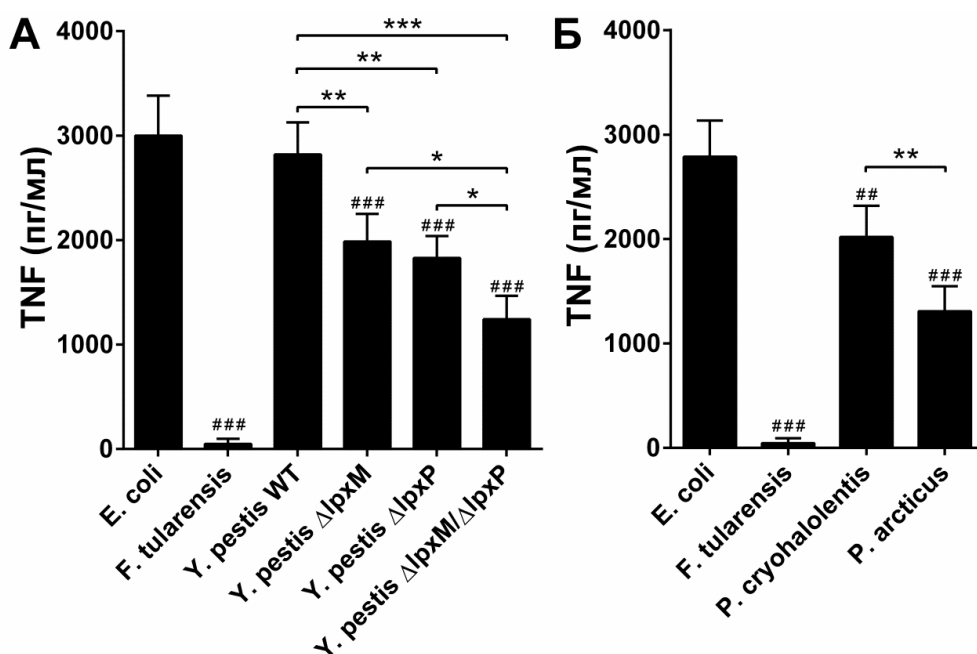


Рис. 5. Слабоацилированные ЛПС хуже индуцируют продукцию TNF макрофагами костномозгового происхождения по сравнению с более ацилированными ЛПС. Уровень продукции TNF макрофагами в ответ на активацию ЛПС из различных штаммов *Y. pestis* KM260(11) (А) и *Psychrobacter* spp. (Б) измеряли методом иммуноферментного анализа. Данные получены в четырех независимых экспериментах и представлены в виде средних значений \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA с пост-тестом Tukey). # $P < 0.01$, # # $P < 0.001$ – статистически значимое отличие в продукции TNF после активации макрофагов ЛПС из различных бактерий по сравнению с ЛПС из *E. coli*.

Липид А из *B. mallei* имеет в среднем более длинные ацильные цепи (С14–16) по сравнению с липидом А из *E. coli*, однако демонстрирует более низкую биоактивность (рис. 3-4). Это может объясняться более низкой степенью ацилированности ЛПС из *B. mallei*: основные варианты липида А представлены пента- и тетраацилированными формами, в то время как липид А из *E. coli* является гексаацилированным. Также у части

молекул ЛПС из *B. mallei* одна из фосфатных групп липида А гликозилирована остатком катионного моносахарида 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозы (Ara4N), что может снижать биоактивность ЛПС вследствие частичной нейтрализации отрицательного заряда фосфатных групп, необходимых для взаимодействия с положительно заряженными аминокислотными остатками TLR4. Более подробно такое взаимодействие будет рассмотрено в следующей главе. ЛПС из *C. jejuni* также имеет более низкую биоактивность по сравнению с ЛПС из *E. coli* (рис. 3-4), что может объясняться присутствием тетраацилированных форм липида А наряду с гексаацилированными вариантами, а также наличием остатков фосфоэтаноламина, присоединенных к фосфатным группам в части молекул липида А.

ЛПС из *A. baumannii* имеет высокую биоактивность, как и ЛПС из *E. coli*, что согласуется с наличием в составе обоих штаммов высокоацилированных форм липида А (рис. 3-4). ЛПС из *P. aeruginosa* не индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов в культуре костномозговых макрофагов (рис. 3-4), что коррелирует с низкой степенью ацилированности его липида А, который состоит из три- и тетраацилированных форм. Помимо этого, липид А из *P. aeruginosa* имеет в целом более короткие ацильные цепи (C12), а часть молекул лишена фосфатных групп. В то же время тетраацильный липид IVa из *E. coli* (Poltorak et al., 2000) и липид А из двойного мутанта *Y. pestis* KM260(11) Δ lpxM/ Δ lpxP могут индуцировать продукцию провоспалительных цитокинов мышинными макрофагами. Это свидетельствует о том, что наличие четырех ацильных цепей в составе липида А является минимально необходимым, но недостаточным условием полноценного запуска сигнального пути от мышинового TLR4. В таком случае биоактивность тетраацилированного ЛПС будет определяться длиной ацильных цепей, отсутствием фосфатных групп или присутствием на них катионных заместителей.

Анализ биологических активностей различных ЛПС показал, что существует прямая корреляция между количеством и размером ацильных цепей липида А и его активностью: чем больше ацильных цепей содержится в липиде А и чем они длиннее, тем выше продукция провоспалительных цитокинов ответ на ЛПС. Причем количество ацильных групп сильнее влияет на биоактивность ЛПС, чем их длина.

1.3. ЛПС, содержащий липид А с гликозилированными фосфатными группами, имеет сниженную биоактивность

Как было сказано ранее, степень распознавания ЛПС сигнальным комплексом TLR4/MD-2 определяется в первую очередь гидрофобными взаимодействиями ацильных групп липида А с β -карманом корцептора MD-2 и с неполярными аминокислотными остатками TLR4 (Park et al., 2009). Тем не менее, роль ионных взаимодействий (фосфатные группы липида А – заряженные аминокислотные остатки TLR4) нельзя недооценивать, особенно на начальных этапах «заякоривания» молекулы ЛПС в TLR4/MD-2 комплексе. Для оценки вклада фосфатных групп в это взаимодействие была изучена биологическая активность ЛПС, выделенных из аттенуированного штамма чумной палочки *Y. pestis* KM260(11) дикого типа и его

мутанта по гену *arnT*, кодирующего ArnT-трансферазу, ответственную за гликозилирование фосфатных групп липида А остатками катионного сахара 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозы (Дентовская и соавт., 2011). ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) Δ arnT, как и *Y. pestis* KM260(11) дикого типа, состоит из гексаацилированного липида А, в котором четыре первичные 3-гидрокситетрадеcanoильные группы (3НО14:0) присоединены к двум 1,4-бисфосфорилированным остаткам глюкозамина, а вторичные цепи представлены лауроильной (12:0) и пальмитолеильной (16:1) группами. Однако, ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) дикого типа имеет присоединенные к фосфатам положительно заряженные 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозные остатки, которые могут частично нейтрализовать отрицательный заряд фосфатных групп, в то время как мутантный штамм *Y. pestis* KM260(11) Δ arnT лишен этих катионных остатков.

Биологическую активность этих ЛПС определяли, измеряя продукцию TNF макрофагами костномозгового происхождения, а также эффективность запуска TLR4-NF κ B сигнального пути с помощью NF κ B-зависимой репортерной плазмиды в RAW264.7 макрофагах. ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) Δ arnT с незранированными фосфатными группами липида А индуцировал более сильный уровень активации NF κ B репортера и продукцию TNF в макрофагах, чем ЛПС с гликозилированными фосфатами из *Y. pestis* KM260(11) WT, что свидетельствует об участии фосфатных групп ЛПС во взаимодействии с TLR4 (рис. 6).

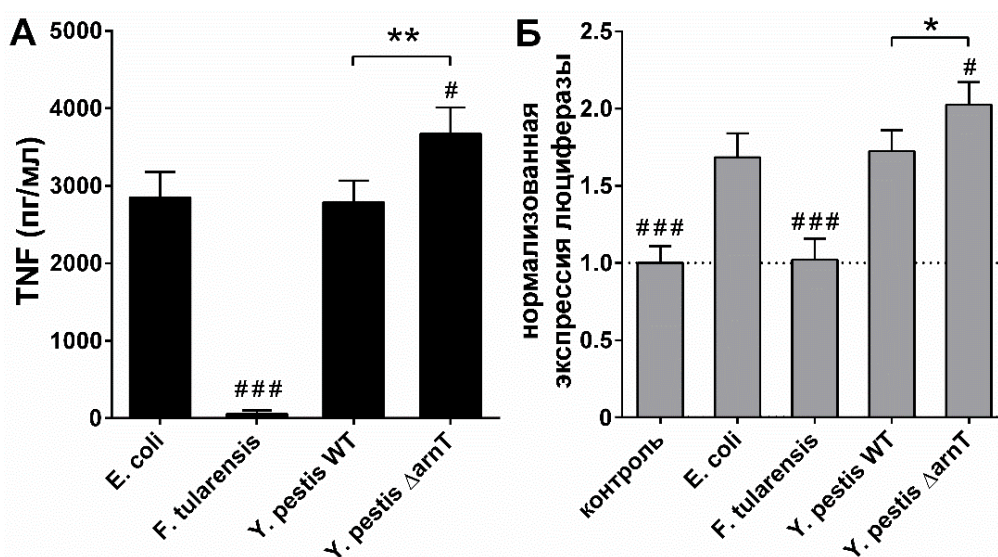


Рис. 6. ЛПС со свободными фосфатными группами липида А, выделенный из *Y. pestis* KM260(11) Δ arnT, индуцирует более сильный уровень продукции TNF (А) и активации NF κ B-зависимого репортера (Б), чем ЛПС с гликозилированными фосфатами из *Y. pestis* KM260(11) дикого типа. Контрольная группа была трансфицирована репортерными конструктами без активации ЛПС. Данные получены в пяти независимых экспериментах и представлены в виде средних значений \pm SD. Статистическая обработка производилась с использованием однонаправленного ANOVA с пост-тестом Tukey для множественных парных сравнений, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. # $P < 0.05$ и ### $P < 0.001$ – статистически значимое отличие в продукции TNF (А) или уровне экспрессии люциферазы (Б) после активации макрофагов ЛПС из различных бактерий по сравнению с ЛПС из *E. coli*.

Для более подробного выяснения молекулярных аспектов взаимодействия фосфатных групп с TLR4 было решено создать панель мутантных вариантов TLR4 с точечными заменами аминокислотных остатков, потенциально взаимодействующих с фосфатными группами липида А. Ранее было показано, что в составе TLR4 есть положительно заряженные аминокислотные остатки аргинина (R) и лизина (K), которые могут взаимодействовать с фосфатными группами липида А: K263, R266, R337, K341, K360, K367 и K434, причем два последних располагаются на втором мономере mTLR4 (Meng et al, 2011). Эти аминокислоты были выбраны для мутирования в качестве положительного контроля, а также с целью определения наиболее важных из них для взаимодействия ЛПС-TLR4. Подбор других аминокислотных остатков для проведения точечного мутагенеза осуществлялся с помощью анализа кристаллической структуры комплекса TLR4/MD-2 – липид А (PDB ID: 3VQ1) в программе The PyMOL Molecular Graphics System (DeLano Scientific LLC, США). Анализ пространственной структуры комплекса показал, что рядом с фосфатными группами ЛПС располагаются остаток тирозина Y291, остаток аспарагиновой кислоты D393, а также остатки серина S317, S386 и S413. Для точечной замены был выбран аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты D393, поскольку данная аминокислота является отрицательно заряженной, как и фосфатные группы липида А, и таким образом может способствовать более плохому взаимодействию ЛПС с TLR4. Отобранные заряженные аминокислотные остатки заменяли на нейтрально заряженный аланин.

Сайт-направленный мутагенез осуществляли методом двухстадийной ПЦР с перекрывающимися праймерами, содержащими точечные замены необходимых нуклеотидов. Полученными конструкциями трансфицировали макрофаги костномозгового происхождения из мышей, дефицитных по гену *Tlr4*. Помимо конструкторов с мутированными вариантами TLR4 костномозговые макрофаги котрансфицировали плазмидой pEGFP-N1 (Clontech, США) с экспрессирующимся зеленым флуоресцентным белком для контроля эффективности трансфекции и последующей селекции трансфицированных клеток с помощью клеточного сортера.

Таким образом, для оценки роли конкретных аминокислот во взаимодействии с ЛПС, была получена панель макрофагов костномозгового происхождения, экспрессирующих варианты TLR4 с отличающимися аминокислотными остатками. Для проверки способности мутантных вариантов TLR4 запускать сигнальный каскад, приводящий к продукции провоспалительных цитокинов, полученную панель костномозговых макрофагов активировали ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) ΔarnT и *Y. pestis* KM260(11) дикого типа, после чего определяли уровень продукции TNF (рис. 7).

Tlr4-дефицитные макрофаги, трансфицированные вектором с последовательностью TLR4 дикого типа, и активированные различающимися вариантами ЛПС, продемонстрировали уровень продукции TNF, качественно сходный с уровнем активации NFκB репортера и экспрессией TNF в макрофагах дикого типа (рис. 6): ЛПС с неэкранированными фосфатными группами сильнее индуцировал активацию TLR4 сигнального пути в макрофагах, чем ЛПС с гликозилированными фосфатными группами. *Tlr4*-дефицитные макрофаги, трансфицированные плазмидой с

последовательностью TLR4, где были одновременно мутированы все положительно заряженные аминокислотные остатки, одинаково эффективно распознавали ЛПС с гликозилированными и свободными фосфатными группами. Это говорит о том, что если убрать положительный заряд с аминокислотных остатков TLR4, взаимодействующих с липидом А, то присутствие на липиде А отрицательного заряда свободных фосфатных групп или же его экранирование 4-амино-4-дезоксид-*L*-арабинозой не повлияет на биоактивность ЛПС. В то же время *Tlr4*-дефицитные макрофаги, трансфицированные конструктами с единично мутированными аминокислотными остатками рецептора, по профилю экспрессии TNF не отличались от макрофагов, трансфицированных плазмидой с последовательностью TLR4 дикого типа (рис. 7). Это можно объяснить тем, что чувствительности используемых подходов не хватило для более точного определения вклада отдельных аминокислотных остатков TLR4 во взаимодействие с фосфатными группами липида А. Полученные результаты показывают, что если липид А не несет отрицательного заряда, то наличие заряженных аминокислотных остатков на TLR4 не повлияет на эффективность взаимодействия ЛПС-TLR4, однако если липид А несет неэкранированный отрицательный заряд, то взаимодействие ЛПС-TLR4 усиливается за счет положительно заряженных аминокислотных остатков в его составе.

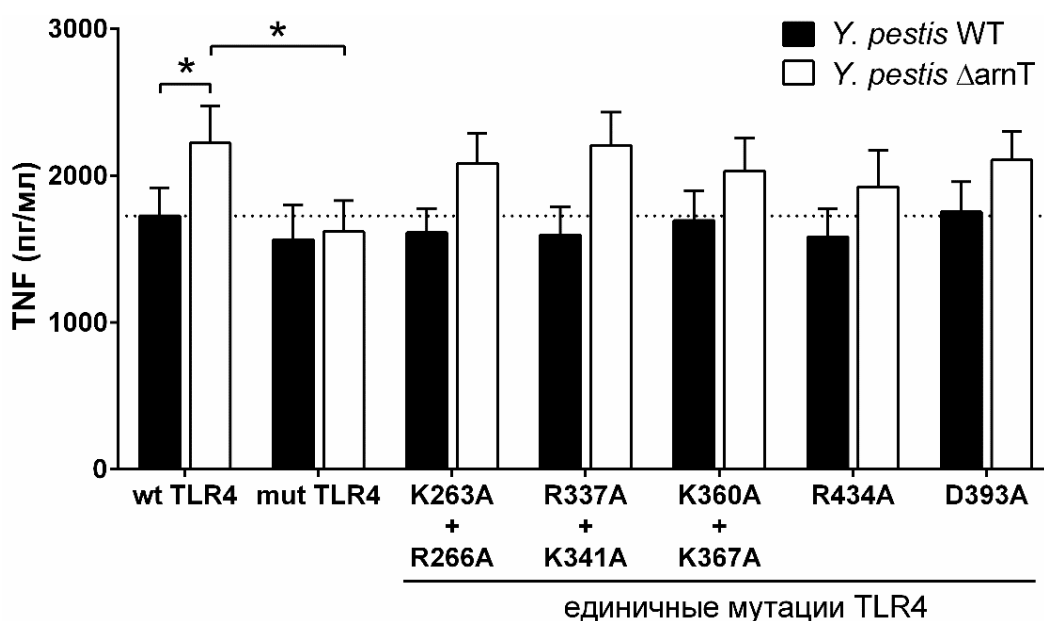


Рис. 7. TLR4 с точечными мутациями положительно заряженных аминокислот, с равной эффективностью распознает ЛПС с гликозилированными (*Y. pestis* KM260(11) WT) и свободными (*Y. pestis* KM260(11) Δ arnT) фосфатными группами липида А. Костномозговые макрофаги из мышей, дефицитных по гену *Tlr4*, были трансфицированы плазмидами, содержащими последовательность TLR4 дикого типа (wt TLR4), с мутированными лизином в положении 263 и аргинином 266 (K263A + R266A), с мутированными аргинином 337 и лизином 341 (R337A + K341A), с мутированными лизином 360 и лизином 367 (K360A + K367A), с мутированным аргинином 434 (R434A), с мутированным остатком аспарагиновой кислоты 393 (D393A) и с одновременно мутированными вышеперечисленными положительно заряженными аминокислотными остатками (mut TLR4). Данные получены в четырех независимых экспериментах и представлены в виде среднего значения \pm SD. * $P < 0.05$ (ANOVA с пост-тестом Tukey).

Для оценки релевантности наблюдаемого эффекта *in vivo* биологическая активность этих ЛПС была изучена в мышинной модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Галактозамином (D-Гал). Для индукции острой гепатотоксичности мышам вводили внутривентриально ЛПС из штаммов *Y. pestis* KM260(11) ΔarnT и *Y. pestis* KM260(11) дикого типа совместно с D-Гал. D-Гал вводился в неизменной концентрации (800 мкг/г веса), а концентрация ЛПС варьировалась (400 нг/г веса, 50 нг/г веса, 5 нг/г веса и 0,1 нг/г веса), чтобы обнаружить значимое различие в выживаемости между экспериментальными группами мышей. В результате оказалось, что максимальная разница в выживаемости групп мышей наблюдалась при полублетальной дозе ЛПС 5 нг/г веса. Несмотря на то, что ни одна из экспериментальных групп не показала абсолютную смертность, было обнаружено отличие в кинетике выживаемости – ЛПС со свободными фосфатными группами оказался более токсичным, чем ЛПС с гликозилированными фосфатными группами, что согласуется с полученными *in vitro* данными, о различии биологической активности ЛПС из этих штаммов чумной палочки, но в то же время свидетельствует о том, что биоактивность ЛПС в первую очередь определяется гидрофобным взаимодействием ацильных цепей липида А с комплексом TLR4/MD-2, а не ионными связями между фосфатными группами липида А и положительно заряженными аминокислотными остатками TLR4.

Полученные результаты подтверждают то, что гликозилирование остатками 4-амино-4-дезокси-L-аминоарабинозы фосфатных групп липида А приводит к ухудшению их взаимодействия с положительно заряженными аминокислотными остатками TLR4, и, как следствие, к снижению биоактивности ЛПС.

2. Роль TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках, в мышинной модели ЛПС/D-Гал индуцируемой острой гепатотоксичности

2.1. Характеристика мышей с кондиционным генетическим нокаутом TLR4

Ранее в лаборатории молекулярных механизмов иммунитета ИМБ РАН (заведующий – акад. С.А. Недоспасов) были получены мыши с «флоксированными» аллелями гена *Tlr4* (TLR4^{flox/flox}). В случае делеции в клетках зародышевого пути этот вариант генетического нокаута гена *Tlr4* полностью нарушает функциональность рецептора вследствие делеции практически всей белок-кодирующей части гена, в отличие от классической модели нокаута TLR4 с миссенс-мутацией аминокислотного остатка во внутриклеточной части рецептора (Poltorak et al., 1998). TNF-RI^{flox/flox} мыши были охарактеризованы ранее (Van Hauwermeiren et al., 2013). Для получения мышей с тканеспецифической делецией в миелоидных клетках гена *Tlr4* (M-TLR4^{-/-}) или гена *Tnfrsf1a* (M-TNF-RI^{-/-}) их скрещивали с мышами, конститутивно экспрессирующими рекомбиназу Cre под контролем промотора гена лизоцима M (LysM-Cre) (Clausen et al., 1999). Для получения мышей с двойной делецией генов *Tlr4* и *Tnfrsf1a* в миелоидных клетках (M-TLR4-TNF-RI^{-/-}) скрещивали TLR4^{flox/flox} и TNF-RI^{flox/flox} мышей, а затем уже гомозиготное «флоксированное» потомство TLR4^{flox/flox} TNF-RI^{flox/flox} скрещивали с LysM-Cre мышами. В экспериментах в качестве контроля дикого типа использовали

мышей из одного помета с «флоксированным» геном, но без экспрессии Cre-делитора (литтермейт-контроль). Все использованные в работе мыши имели в качестве генетической основы линию C57Bl/6.

Для определения эффективности вырезания Cre-рекомбиназой «флоксированного» аллеля TLR4^{flox/flox}, были определены уровни экспрессии гена *Tlr4* в TLR4^{-/-}, M-TLR4^{-/-} и мышях, несущих «флоксированный» аллель дикого типа. Из этих линий мышей были получены культуры макрофагов костномозгового происхождения, из которых были выделены геномная ДНК и мРНК, после чего с помощью аллель-специфической ПЦР в реальном времени была произведена оценка относительной экспрессии TLR4. ПЦР анализ продемонстрировал высокую степень удаления гена (>98%) в макрофагах из M-TLR4^{-/-} и TLR4^{-/-} мышей. Дополнительно была измерена продукция провоспалительного цитокина TNF костномозговыми макрофагами в ответ на добавление биоактивного ЛПС. Уровень продукции TNF в макрофагах из M-TLR4^{-/-} и TLR4^{-/-} мышей был на сходном низком уровне по сравнению с мышами дикого типа. Такая высокая эффективность делеции *Tlr4* гена в макрофагах из M-TLR4^{-/-} мышей позволяет использовать этих мышей в качестве релевантной модели для *in vivo* изучения роли TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках.

2.2. Мыши с дефицитом TLR4 в миелоидных клетках погибают в модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Галактозамином

Ранее было показано, что в мышинной модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Галактозамином (D-Гал), провоспалительный цитокин TNF является основным фактором патогенности, поскольку системное удаление TNF приводит к выживанию мышей, в отличие от мышей дикого типа (Marino et al., 1997). Причем известно, что основными источниками «патогенного» TNF являются миелоидные клетки, поскольку мыши с делецией TNF в клетках, экспрессирующих лизоцим M, выживают в модели острой гепатотоксичности (Grivennikov et al., 2005). Также было показано, что мыши с миссенс-мутацией в TLR4 рецепторе, нарушающей его сигнальный путь, устойчивы к ЛПС токсичности (Poltorak et al., 1998). Из этих наблюдений следует, что при септическом шоке, ЛПС активирует TLR4-сигналинг в миелоидных клетках, после чего они начинают продуцировать «патогенный» TNF, вследствие чего мыши погибают. Роль TLR4, экспрессирующегося на миелоидных клетках мыши, была изучена в модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Гал. Для этого мышам дикого типа, мышам с полной делецией TLR4 и делецией TLR4 в миелоидных клетках внутрибрюшинно ввели ЛПС/D-Гал, после чего следили за их выживаемостью. Как и ожидалось, все мыши дикого были восприимчивы к токсичности ЛПС/D-Гал, тогда как мыши с полной делецией TLR4 выжили (рис. 8). Все M-TLR4^{-/-} мыши погибли, указывая на то, отсутствие TLR4 на продуцирующих «патогенный» TNF миелоидных клетках, не является достаточным условием для защиты мышей от ЛПС/D-Гал индуцированной токсичности. Таким образом, получается, что в M-TLR4^{-/-} мышях критически важный для развития патологического состояния TLR4 экспрессируется не на миелоидных клетках.

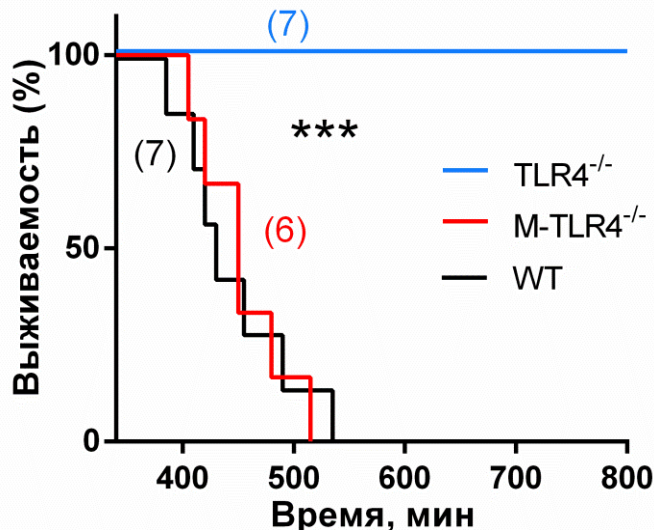


Рис. 8. Мыши с дефицитом TLR4 в миелоидных клетках (M-TLR4^{-/-}), как и мыши дикого типа (WT), гибнут в модели острой гепатотоксичности, в то время как мыши с полным нокаутом TLR4 (TLR4^{-/-}) выживают. Мышам вводили ЛПС (400 нг/г веса) и D-Гал (800 мкг/г веса). Графики представлены в виде кривых выживаемости Каплана-Мейера. ***P < 0.001 (логранговый тест, критерий Мантеля-Кокса) означает значимое отличие в динамике смертности TLR4^{-/-} мышей от WT и M-TLR4^{-/-} мышей.

Цифрами указано используемое в опыте количество мышей соответствующего генотипа.

Все M-TLR4^{-/-} мыши погибли, указывая на то, отсутствие TLR4 на продуцирующих «патогенный» TNF миелоидных клетках, не является достаточным условием для защиты мышей от ЛПС/D-Гал индуцированной токсичности. Таким образом, получается, что в M-TLR4^{-/-} мышях критически важный для развития патологического состояния TLR4 экспрессируется не на миелоидных клетках. Для дополнительной характеристики M-TLR4^{-/-} мышей в модели гепатотоксичности была определена активность ферментов трансаминаз в сыворотке крови у M-TLR4^{-/-}, TLR4^{-/-} и мышей дикого типа после введения ЛПС/D-Гал, либо PBS (рис. 9).

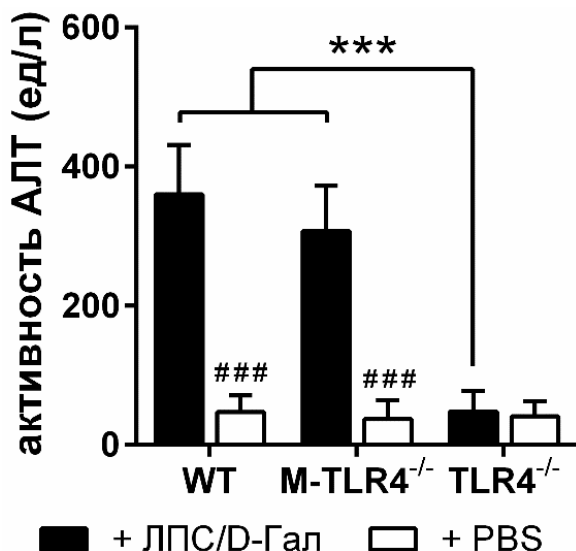


Рис. 9. M-TLR4^{-/-} мыши, как и мыши дикого типа, имеют высокую активность аланинаминотрансферазы в крови в модели ЛПС/D-Гал токсичности. Активность АЛТ определяли в сыворотках крови мышей через 4 ч после введения ЛПС/D-Гал, либо PBS. Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены в виде средних значений ± SD. ***P < 0.001 (ANOVA с пост-тестом Tukey). ###P < 0.001 – статистически значимое отличие активности АЛТ у мышей, которым вводили PBS, по сравнению с мышами, которым вводили ЛПС/D-Гал.

Уровни активности аминотрансфераз не изменялись у TLR4^{-/-} мышей, но повышались у M-TLR4^{-/-} и WT мышей. Также были измерены уровни продукции провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в сыворотке крови M-TLR4^{-/-}, TLR4^{-/-} и WT мышей в ответ на индукцию острой гепатотоксичности (рис. 11). Мыши с делецией TLR4 в миелоидных клетках продуцировали меньше провоспалительных цитокинов в

кровь, чем мыши дикого типа, но уровень продукции TNF и IL-6 у этих мышей был значительно выше, чем у мышей с полным нокаутом TLR4. Получается, что делеция TLR4 на миелоидных клетках не отменяет системной продукции TNF при введении ЛПС/D-Гал в M-TLR4^{-/-} мышей. Повышение уровней активности трансаминаз и продукции провоспалительных цитокинов в M-TLR4^{-/-} и WT мышах свидетельствуют о развитии в них сходного патологического состояния в ответ на индуцированную токсичность.

2.3. TNF является основным фактором патогенности в модели острой гепатотоксичности у M-TLR4 дефицитных мышей

Поскольку M-TLR4^{-/-} мыши не показали ожидаемой от них выживаемости в модели ЛПС/D-Гал индуцированной токсичности, то было решено проверить, является ли TNF главным фактором патогенности для этих мышей, как и для мышей дикого типа. Для этого M-TLR4^{-/-} и WT мышам внутрибрюшинно ввели блокирующие антитела к TNF за 30 мин до введения ЛПС/D-Гал, затем следили за выживаемостью. После системной анти-TNF терапии выжили как мыши дикого типа, так и мыши с делецией TLR4 в миелоидных клетках, что свидетельствует о том, что TNF выступает в роли основного фактора патогенности и для M-TLR4^{-/-} мышей (рис. 10).

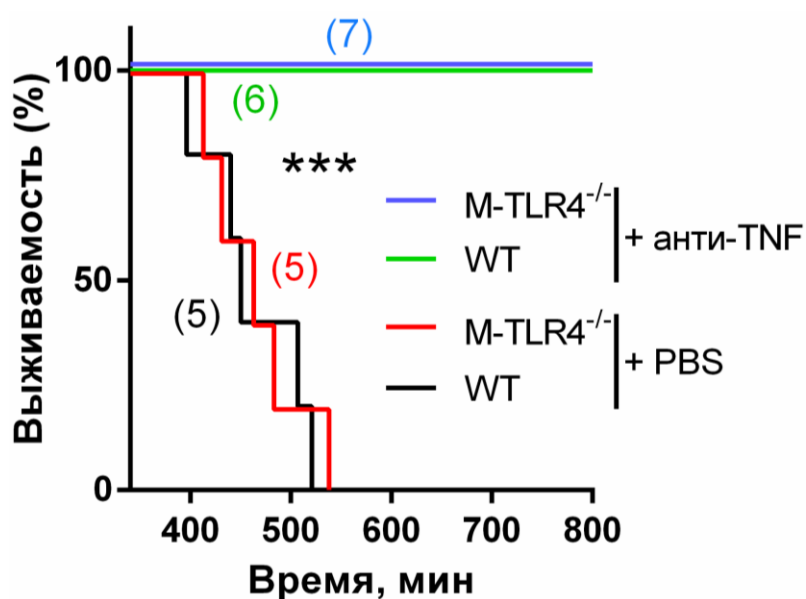


Рис. 10. Системная блокировка TNF способствует выживанию мышей дикого типа (WT) и мышей с делецией TLR4 в миелоидных клетках (M-TLR4) при индукции острой гепатотоксичности. За 30 мин до введения ЛПС (400 нг/г веса) и D-Гал (800 мкг/г веса) мышам внутрибрюшинно вводили антитела против TNF (клон XT3.11, 35 мкг/г веса). Контрольным группам мышей вводили PBS. Графики представлены в виде кривых

выживаемости Каплана-Мейера. ***P < 0.001 (логранговый тест, критерий Мантеля-Кокса) означает значимое отличие в динамике смертности мышей с системной блокировкой TNF от мышей без блокировки. В скобках указано используемое в опыте количество мышей соответствующего генотипа.

Для определения влияния системной блокировки TNF на M-TLR4^{-/-} мышей в модели острой гепатотоксичности измеряли уровень продукции провоспалительных цитокинов. Концентрация IL-6 в сыворотке крови как мышей с делецией TLR4 в миелоидных клетках, так и WT мышей снижалась после введения блокирующих антител против TNF по сравнению с мышами, которым вместо блокатора вводили PBS в модели ЛПС/D-Гал токсичности (рис. 11Б). Результаты по измерению уровня продукции

цитокинов в крови после анти-TNF терапии приведены только для IL-6, поскольку блокирующие антитела против TNF могут конкурировать за сайт связывания с детектирующими TNF антителами из коммерческого набора для проведения иммуноферментного анализа.

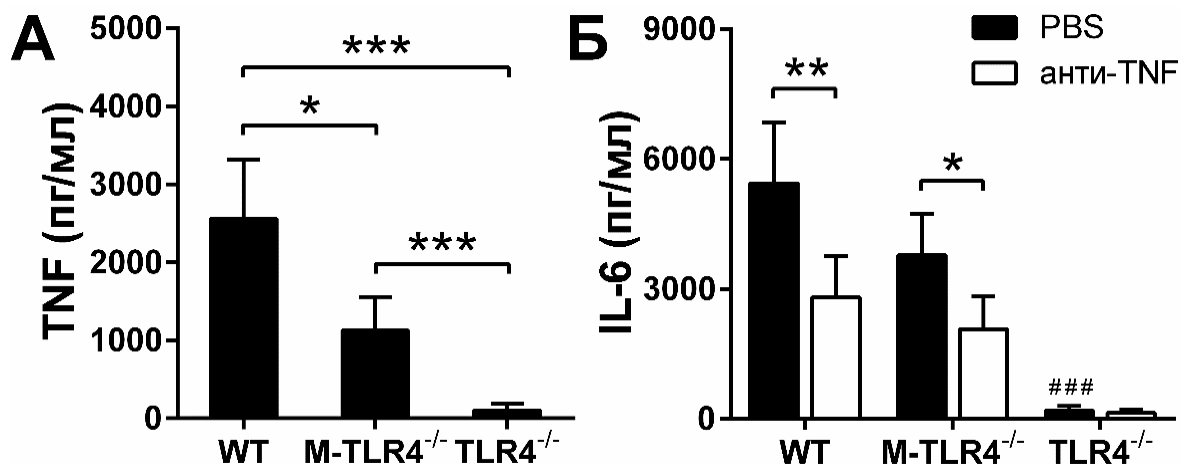


Рис. 11. M-TLR4^{-/-} мыши и мыши дикого типа снижают уровень IL-6 в крови после системного блокирования TNF в модели острой гепатотоксичности. За 30 мин до введения ЛПС/D-Гал мышам вводили блокатор TNF (35 мкг/г веса), либо PBS. Взятие крови проводилось через 1,5 ч после введения ЛПС/D-Гал, концентрацию TNF (А) и IL-6 (Б) в сыворотке крови определяли иммуноферментным анализом. Данные получены в четырех независимых экспериментах и представлены в виде средних значений ± SD. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (ANOVA с пост-тестом Tukey). ###P < 0.001 означает значимое отличие уровня IL-6 в TLR4^{-/-} мышах по сравнению с WT и M-TLR4^{-/-}.

Для дополнительной оценки влияния анти-TNF терапии на общее патологическое состояние M-TLR4^{-/-} мышей в модели острой гепатотоксичности определяли активность аминотрансфераз в сыворотке крови. И M-TLR4^{-/-} мыши и мыши дикого типа показали снижение активности трансаминаз в результате системной блокировки TNF. Таким образом, центральная роль TNF в этой модели была дополнительно подтверждена эффектом системной анти-TNF терапии у M-TLR4^{-/-} мышей. Получается, что TLR4 необходим для продукции «патогенного» TNF миелоидными клетками, однако критически важный TLR4 находится на других клетках.

2.4. TNF может функционировать в роли промежуточного активатора дефицитных по гену *Tlr4* миелоидных клеток в модели острой гепатотоксичности

Поскольку в модели ЛПС/D-Гал токсичности удаление TLR4 на миелоидных клетках не привело к повышению выживаемости мышей, а также улучшению их общего патологического состояния, то была выдвинута гипотеза о том, что другие клетки, экспрессирующие TLR4, могут распознать ЛПС и начать продуцировать медиаторы воспаления, которые уже будут стимулировать миелоидные клетки с делецией TLR4 к продукции «патогенного» TNF. Для проверки того, может ли TNF являться не только основным фактором патогенности в модели острой гепатотоксичности, но и промежуточным активатором TLR4^{-/-} миелоидных клеток, была получена линия мышей

с тканеспецифической делецией генов *Tlr4* и *Tnfrsf1a* в миелоидных клетках, поскольку известно, что TNF-RI является основным рецептором TNF, опосредующим его патогенность (Pfeffer et al., 1993; Rothe et al., 1993). Также в качестве контрольной группы были получены мыши с делецией TNF-RI в миелоидных клетках. Полученным мышам внутрибрюшинно вводили ЛПС/D-Гал, после чего наблюдали за динамикой смертности. Все M-TNF-RI^{-/-}, M-TLR4^{-/-} и WT мыши погибли на 7-8 ч после начала эксперимента, в то время как M-TLR4^{-/-}TNFR1^{-/-} мыши начали гибнуть существенно позже, причем часть мышей выжила (рис. 12). Также были измерены концентрации провоспалительных цитокинов TNF и IL-6 в сыворотке крови. Оказалось, что в кровь M-TLR4^{-/-}TNFR1^{-/-} мышей продуцируется значительно меньшее количество TNF, по сравнению с WT, M-TNF-RI^{-/-} и M-TLR4^{-/-} мышами, в то время как уровень IL-6 в крови всех мышей был на сходном уровне.

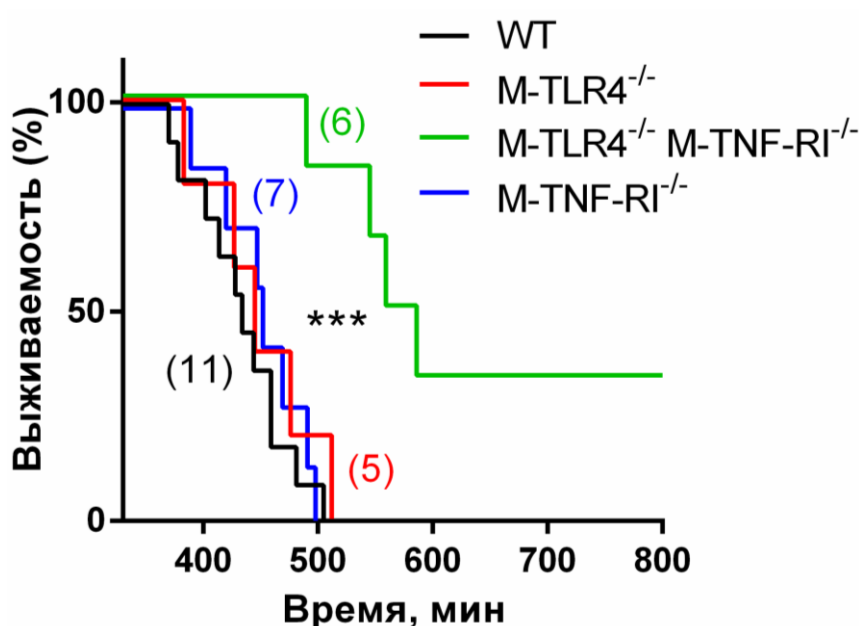


Рис. 12. Мыши с двойной делецией TLR4 и TNF-RI в миелоидных клетках лучше выживают в модели острой гепатотоксичности по сравнению с M-TNF-RI^{-/-}, M-TLR4^{-/-} и WT мышами. Мышам вводили ЛПС/D-Гал, после чего следили за их выживаемостью. Графики представлены в виде кривых выживаемости Каплана-Мейера. *** $p < 0.001$ (логранговый тест, критерий

Мантеля-Кокса) означает значимое отличие в динамике смертности M-TLR4^{-/-}TNFR1^{-/-} мышей от WT, M-TNF-RI^{-/-} и M-TLR4^{-/-} мышей. В скобках указано используемое в опыте количество мышей соответствующего генотипа.

Делеция TNF-RI влияет в первую очередь на продукцию TNF, но не IL-6, что может указывать на то, что основным источником IL-6 в этой модели являются другие клетки, или, например, на то, что TNF-RI участвует в активации продукции IL-6 миелоидными клетками. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что TNF является одним из ключевых промежуточных цитокинов в активации TLR4^{-/-} миелоидных клеток через TNF-RI в модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Гал. Однако, поскольку M-TLR4^{-/-}TNFR1^{-/-} мыши не продемонстрировали полную выживаемость в этой модели, то вполне возможно, что помимо TNF в роли такого посредника могут выступать и другие медиаторы. Таким образом, нами была подготовлена платформа для дальнейшего изучения роли различных клеточных популяций в опосредованной активации миелоидных клеток с делецией TLR4 в модели ЛПС/D-Гал гепатотоксичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе было проведено сравнительное исследование *in vitro* биологической активности образцов ЛПС, выделенных из различных штаммов грамотрицательных бактерий. Было показано, что биоактивность ЛПС увеличивается с ростом степени ацилированности липида А: чем больше ацильных цепей имеет липид А и чем они длиннее, тем выше активность ЛПС. Также была показана роль гликозилирования фосфатных групп липида А в ухудшении их взаимодействия с положительно заряженными аминокислотными остатками TLR4, что приводит к снижению биоактивности ЛПС. Полученные данные можно использовать для теоретического предсказания уровня биоактивности ЛПС по его структуре и наоборот. Так, например, молекула ЛПС будет обладать максимальной биоактивностью в достаточно узком диапазоне химического строения: в составе такой усредненной молекулы ЛПС будет гексаацилированный липид А со средней длиной ацильных цепей C14, а также свободные фосфатные группы. Изучение структурно-функциональных особенностей активации TLR4 различными вариантами ЛПС помимо фундаментального интереса имеет важное терапевтическое значение. Патогенные бактерии могут использовать ЛПС с низкой биоактивностью, чтобы избежать надлежащего распознавания сигнальным комплексом TLR4/MD-2, обходя таким образом запуск врожденного иммунного ответа хозяина и повышая риск бактериальной диссеминации. С другой стороны, такие малоактивные варианты ЛПС не смогут индуцировать септический шок у восприимчивых пациентов (Ramachandran, 2014), что позволит лучше контролировать септические осложнения. Также клинический интерес представляет изучение роли активации сигнального пути TLR4 на канцерогенез и развитие аутоиммунных патологий (Chen et al., 2016; Korneev et al., 2017).

В продолжение изучения дифференциальной токсичности различных ЛПС в мышинной модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Гал, была исследована роль экспрессирующегося на миелоидных клетках TLR4. Было показано, что мыши с делецией TLR4 в миелоидных клетках имеют повышенный уровень активности аминотрансфераз и увеличенную продукцию провоспалительных цитокинов в крови, более того они погибают в модели ЛПС/D-Гал гепатотоксичности, как и мыши дикого типа. С использованием системной блокировки TNF, было подтверждено, что TNF является главным фактором патогенности в этой модели у M-TLR4^{-/-} мышей, как и у мышей дикого типа. Были получены мыши с двойной делецией TLR4 и TNF-R1 в миелоидных клетках и показано, что TNF в модели острой гепатотоксичности может выступать в роли промежуточного активатора миелоидных клеток в M-TLR4^{-/-} мышах. Дальнейшие исследования будут направлены на выявление и изучение клеточной субпопуляции, инициирующей продукцию «патогенного» TNF миелоидными клетками в M-TLR4 дефицитных мышах.

ВЫВОДЫ

1. Изученные ЛПС из различных штаммов грамотрицательных бактерий специфически передают сигнал через TLR4 сигнальный комплекс, причем их биологический эффект будет определяться активацией мишеней как MyD88-зависимого (TNF, IL-6, IL-1 β), так и MyD88-независимого (RANTES, IP-10) сигнальных путей.
2. Для исследованных ЛПС была показана прямая корреляция между степенью ацилированности липида А и биологической активностью: чем больше ацильных цепей содержится в липиде А и чем они длиннее, тем выше биоактивность ЛПС, причем количество ацильных групп сильнее влияет на биоактивность ЛПС, чем их размер.
3. ЛПС из *Y. pestis* KM260(11) дикого типа, содержащий липид А с гликозилированными остатками 4-амино-4-дезоксид-аминоарабинозы фосфатными группами, имеет сниженную биоактивность, предположительно вследствие менее эффективного взаимодействия с TLR4.
4. В модели острой гепатотоксичности, индуцированной ЛПС/D-Гал, TNF не только приводит к гибели мышей с делецией гена TLR4 в миелоидных клетках, но и выступает в роли промежуточного активатора TLR4-дефицитных миелоидных клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:

1. **Корнеев К.В.**, Кондакова А.Н., Арбатский А.П., Новотоцкая-Власова К.А., Ривкина Е.М., Анисимов А.П., Круглов А.А., Купраш Д.В., Недоспасов С.А., Книрель Ю.А., Друцкая М.С. Различия в биологической активности липополисахаридов в зависимости от степени ацилирования липида А из мутантных штаммов *Yersinia pestis* и бактерий рода *Psychrobacter* // Биохимия. 2014. Т. 79, № 12. С. 1629-1635. Импакт-фактор (WoS) – 1.719.
2. **Korneev K.V.**, Arbatsky N.P., Molinaro A., Palmigiano A., Shaikhutdinova R.Z., Shneider M.M., Pier G.B., Kondakova A.N., Sviriaeva E.N., Sturiale L., Garozzo D., Kruglov A.A., Nedospasov S.A., Drutskaya M.S., Knirel Y.A., Kuprash D.V. Structural relationship of the lipid A acyl groups to activation of murine Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharides from pathogenic strains of *Burkholderia mallei*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* // Front. Immunol. 2015. Т. 6. С. 595. Импакт-фактор (WoS) – 6.059.
3. **Korneev K.V.**, Atretkhany K.-S.N., Drutskaya M.S., Grivennikov S.I., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. TLR-signaling and proinflammatory cytokines as drivers of tumorigenesis // Cytokine. 2017. Т. 89. С. 127-135. Импакт-фактор (WoS) – 3.148.
4. **Korneev K.V.**, Kondakova A.N., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Palmigiano A., Kruglov A.A., Telegin G.B., Drutskaya M.S., Sturiale L., Garozzo D., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kuprash D.V. Hypoacylated LPS from foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* induces moderate TLR4-mediated inflammatory response in murine macrophages // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2018. Т. 8. С. 58. Импакт-фактор (WoS) – 4.855.

Тезисы конференций:

1. **Корнеев К.В.**, Кондакова А.Н., Арбатский Н.П., Анисимов А.П., Круглов А.А., Купраш Д.В., Недоспасов С.А., Книрель Ю.А., Друцкая М.С. Активация сигнальной оси TLR4–TNF в мышинных макрофагах при воздействии различными лигандами на рецепторы врожденного иммунитета // Сборник тезисов XV Всероссийской молодежной научной школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии. 2014. С. 62.
2. **Korneev K.V.**, Sviriaeva E.N., Kondakova A.N., Arbatsky N.P., Anisimov A.P., Molinaro A., Palmigiano A., Sturiale L., Garozzo D., Kruglov A.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kuprash D.V. Novel aspects of the contribution by the lipid A acyl groups to Toll-like receptor 4 activation by lipopolysaccharide // FEBS J. 2015. Т. 282. № S1. С. 238. Импакт-фактор (WoS) – 4.237.
3. **Korneev K.V.**, Sviriaeva E.N., Kondakova A.N., Arbatsky N.P., Anisimov A.P., Kruglov A.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kuprash D.V. Activation of Toll-like receptor 4 signaling in murine macrophages by non-canonical lipopolysaccharides from various Gram-negative bacteria // Сборник тезисов 11th Spring School on Immunology. 2015. С. 90-91.
4. **Корнеев К.В.**, Свиряева Е.Н., Кондакова А.Н., Круглов А.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А., Книрель Ю.А., Купраш Д.В. Новые аспекты активации Toll-подобного рецептора 4 в костномозговых макрофагах мыши при воздействии различными лигандами на рецепторы врожденного иммунитета // Acta Naturae. 2016. Т. S2. С. 166. Импакт-фактор (WoS) – 2.308.
5. **Korneev K.V.**, Sviriaeva E.N., Kondakova A.N., Kruglov A.A., Kozlov S.V., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kuprash D.V. Production of proinflammatory cytokines by murine macrophages after TLR4 activation by non-canonical LPS and *in vivo* effects of TLR4 ablation on myeloid cells in the model of acute hepatotoxicity // Сборник тезисов EFIS-EJI Ruggero Ceppellini Advanced School of Immunology. 2016. С. 39.
6. **Korneev K.V.**, Sviriaeva E.N., Kondakova A.N., Kruglov A.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kuprash D.V. Lipopolysaccharides with different lipid A acylation status from *Vibrio cholerae* and *Campylobacter jejuni* contribute differently to IL6 production by bone marrow-derived macrophages // FEBS J. 2016. Т. 283. № S1. С. 150. Импакт-фактор (WoS) – 4.237.