

©Коллектив авторов

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB РЕКОМБИНАНТНЫМИ БЕЛКАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В КУЛЬТУРЕ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

**Е.О. Калинин<sup>1\*</sup>, Н.К. Ахматова<sup>1</sup>, И.Д. Макаренко<sup>2</sup>, А.С. Ерохова<sup>3</sup>, Н.А. Михайлова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казенный переулок, 5а; \*эл. почта: eugeniuscallinicus@yandex.ru

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, ул. Сельская, 1

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Транскрипционный фактор NF-κB — ключевой фактор активации иммунных реакций, который, в свою очередь, активируется через ряд паттерн-распознающих рецепторов, таких как TLR- и NLR-рецепторы. Поиск лигандов, активирующих рецепторы врождённого иммунитета, является актуальной научной задачей в связи с возможностью их использования в качестве адъювантов и иммуномодуляторов. Исследовали влияние рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и анатоксина (делеционной атоксической формы экзотоксина А) на активацию рецепторов TLR4, TLR9, NOD1 и NOD2. Для этого использовали свободные и совместно адсорбированные на Al(OH)<sub>3</sub> белки и эукариотические клетки, кодирующие данные рецепторы и имеющие NF-κB-зависимые репортерные гены. Кодируемые ими ферменты способны расщеплять субстрат с образованием окрашенного продукта, концентрация которого указывает на степень активации рецептора. Было выявлено, что анатоксин в свободном и адсорбированном виде способен активировать поверхностный рецептор к липополисахариду TLR4. OprF и анатоксин активировали внутриклеточный рецептор NOD1, но только в свободном виде. Это может быть связано с тем, что использованные клеточные линии не были способны фагоцитировать частицы гидроксида алюминия с адсорбированным на них белком.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas aeruginosa*; TLR; NOD; NF-κB; рекомбинантные белки

**DOI:** 10.18097/PBMC20236903165

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из ключевых компонентов внутриклеточных сигнальных путей, ответственных в организме человека за иммунный ответ, является транскрипционный фактор NF-κB, участвующий в функционировании ряда внутриклеточных сигнальных путей, регулирующих реакции врождённого и адаптивного иммунного ответа [1-3]. Влияние NF-κB обширно и простирается на гены, участвующие в кодировании цитокинов, таких как интерлейкины IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α, гранулоцитарно-моноцитарного колониестимулирующего фактора GM-CSF, хемокинов (таких как IL-8, CCL3, CCL5 и CCL11), белков острой фазы, молекул адгезии, индуцибельных ферментов (например, iNOS, COX-2). Кроме того, NF-κB играет критическую роль в регуляции выживания, активации и дифференцировки клеток врожденного иммунитета и Т-клеток, участвующих в процессах воспаления [1-3].

Активацию NF-κB вызывают различные стимулы, такие как цитокины и лиганды паттерн-распознающих рецепторов и рецепторов суперсемейств TNF, TCR и BCR [1].

В настоящей работе исследовали влияние рекомбинантных белков *Pseudomonas aeruginosa* OprF и анатоксина на паттерн-распознающие рецепторы: (i) toll-подобные рецепторы TLR4 (лигандами которого являются липополисахариды) и TLR9 (лиганд — CpG-богатая ДНК) [2, 3]; (ii) внутриклеточные рецепторы NOD1 и NOD2. Лигандами NOD1 и NOD2 служат муропептиды — фрагменты пептидогликанов, содержащие такие специфические для бактерий структурные мотивы, как γ-D-глутамил-мезо-диаминопимелиновая и N-ацетилмурамовая кислоты [4, 5]. Результаты последних исследований показывают, что лигандами этих рецепторов могут служить и другие вещества [5].

*Принятые сокращения:* ALR – AIM2-подобные рецепторы; AP-1 – активирующий белок-1; BCR – В-клеточный рецептор; CLR – лектин-подобные рецепторы С-типа (CLR); COX-2 – циклооксигеназа-2; iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота; NF-κB – ядерный фактор каппа-бета; NLR – NOD-подобный рецептор; OprF – белок наружной мембраны F *Pseudomonas aeruginosa*; RLR – RIG-I-подобные рецепторы; SEAP – секретируемая эмбриональная щелочная фосфатаза; TCR – Т-клеточный рецептор; TLR – толл-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухоли; ЕЭ – единицы эндотоксина по Международному стандарту эндотоксина; ЕА – единицы активности фермента; МТТ-тест – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (от 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид).

Бактерия *P. aeruginosa* является одним из важнейших возбудителей оппортунистических инфекций в современной клинической практике. В силу распространённости резистентности к антибиотикам среди клинических изолятов этой бактерии, лечение оппортунистических инфекций представляет серьёзную проблему [6]. В связи с этим особенно актуальны исследования методов вакцинопрофилактики инфекций, вызываемых *P. aeruginosa* [7]. В последнее время в вакцинологии уделяется особое внимание механизмам активации врождённого иммунитета под действием вакцин [8]. Изучаются механизмы действия адъювантов, в том числе адъювантные свойства бактериальных белков [9].

Цель работы — исследование активации рецепторов TLR4, TLR9, NOD1 и NOD2 в культуре эукариотических клеток под воздействием белков OprF и анатоксина *P. aeruginosa* (по отдельности, совместно и в адсорбированном на гидроксид алюминия виде). OprF — белок массой 38,9 кДа, а анатоксин — делеционная форма экзотоксина А, не проявляющая токсической активности, но вызывающая образование нейтрализующих антител к экзотоксину А, массой 65,8 кДа [10-12].

## МЕТОДИКА

### Линии клеток

В работе были использованы следующие линии клеток, приобретённые у компании “InvivoGen” (Франция):

1. Raw Blue — клетки макрофагальной лейкемии мыши, индуцированной вирусом Абельсона. Они содержат репортерный ген, кодирующий секреторную эмбриональную щелочную фосфатазу (SEAP), под контролем NF-κB- и AP-1-зависимого промотора и экспрессируют TLR-, NLR- и CLR-рецепторы;

2. HEK293-hTLR4-CD14/MD2 — клетки эмбриональной почки человека, содержащие ген β-галактозидазы под контролем NF-κB/AP-1-зависимого промотора и экспрессирующие рецептор TLR4 и молекулы CD14 и MD2 — компоненты рецепторного комплекса CD14/TLR4/MD2, распознающего липополисахарид;

3. HEK293-TLR9 Blue — клетки эмбриональной почки человека, содержащие репортерный ген SEAP под контролем NF-κB/AP-1-зависимого промотора и экспрессирующие TLR9 рецептор;

4. HEK293-NOD1 — клетки эмбриональной почки человека, содержащие ген β-галактозидазы под контролем NF-κB/AP-1-зависимого промотора и экспрессирующие NOD1 рецептор;

5. HEK293-NOD2 — клетки эмбриональной почки человека, содержащие ген SEAP под контролем NF-κB/AP-1-зависимого промотора и экспрессирующие NOD2 рецептор.

Рекомбинантные формы *P. aeruginosa* были получены в лаборатории протективных антигенов Научно-исследовательского института

вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (НИИВС им. И.И. Мечникова) и исследованы в качестве вакцинных кандидатов [10–12]. Комплекс белков OprF и анатоксина, адсорбированных на геле гидроксида алюминия, показал протективные свойства, большие, чем отдельные белки [13].

Концентрации белков в исследованных препаратах были аналогичны их содержанию в комплексном препарате. Содержание гидроксида алюминия в препаратах адсорбированных белков также было эквивалентным, в 3 раза больше концентрации белка. Были исследованы следующие препараты:

1. OprF (50 мкг/мл) + анатоксин (100 мкг/мл) в 0,9% растворе NaCl;
2. Анатоксин (100 мкг/мл) в 0,9% растворе NaCl;
3. OprF (50 мкг/мл) в 0,9% растворе NaCl;
4. OprF (50 мкг/мл) + анатоксин (100 мкг/мл) + Al(OH)<sub>3</sub> (450 мкг/мл) в 0,9% растворе NaCl;
5. Анатоксин (100 мкг/мл)+Al(OH)<sub>3</sub> (300 мкг/мл) в 0,9% растворе NaCl;
6. OprF (50 мкг/мл) + Al(OH)<sub>3</sub> (150 мкг/мл) в 0,9% растворе NaCl.

В качестве положительного контроля, подтверждающего функциональность рецепторов и репортерных генов, использовали соответствующие лиганды:

1. для контрольной линии клеток HEK293-null и HEK293-null1-k — фактор некроза опухоли TNF-α (“InvivoGen”) в концентрации 10 нг/мл;

2. для TLR4 — липополисахарид *Escherichia coli* серотипа 0111:B4 (“InvivoGen”) в концентрации 1 мкг/мл с активностью 1×10<sup>6</sup> ЕЭ (единиц эндотоксина по Международному стандарту эндотоксина)/мл;

3. для TLR9 — синтетический олигонуклеотид ODN 2006 (“InvivoGen”) в концентрации 1 мкг/мл;

4. для NOD1 — C12-iE DAP (“InvivoGen”) (синтетический фрагмент бактериального пептидогликана) в концентрации 10 мкг/мл;

5. для NOD2 — L18 MDP (“InvivoGen”) в концентрации 1 мкг/мл (производное мурамилдипептида), TDB (“InvivoGen”) (Trehalose-6,6-dibehenate — синтетический аналог трегалозо-6,6-димиколята из *Mycobacterium tuberculosis*) в концентрации 10 мкг/мл для клеток Raw Blue.

Препараты рекомбинантных белков были получены с использованием штаммов-продуцентов *E. coli* в лаборатории протективных антигенов НИИВС им. И.И. Мечникова и очищены методом металл-хелатной аффинной хроматографии до концентрации ~95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли. Содержание эндотоксина, определённое с помощью ЛАЛ-теста ENDOSAFE® ENDOCHROME™ (“Charles River Laboratories”, США), не превышало 35 ЕЭ/мл.

Таким образом, во всех использованных разведениях препаратов содержание липополисахарида было в сотни и тысячи раз меньше, чем в положительном контроле (1000 ЕУ/мл), что исключает возможность стимуляции примесью липополисахарида.

*Измерение уровня экспрессии секреторной щелочной фосфатазы в культуре эукариотических клеток*

Клеточные линии культивировали на питательной среде DMEMx1 (среда Игла, модифицированная Дульбекко) с добавлением 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки крови, 4 мМ L-глутамин и антибиотиков стрептомицин и пенициллина (до конечной концентрации 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина).

Клетки высевали в 96-луночный культуральный планшет из расчёта  $5 \times 10^4$  для клеток линии Raw Blue и  $2,5 \times 10^4$  для клеток линий HEK-NOD2 Blue и HEK-TLR9 Blue в 100 мкл культуральной среды. Через 24 ч инкубации в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) к клеткам вносили исследуемые образцы и контроли. Через 24 ч после внесения лигандов колориметрическим методом оценивали уровень ферментативной активности SEAP, кодируемой NF-κB/AP-1-зависимым геном [14]. Метод основан на измерении скорости расщепления бесцветного субстрата (динатриевой соли нитрофенилфосфата) с образованием паранитрофенола жёлтого цвета. Интенсивность окраски раствора, а, следовательно, значение оптической плотности, прямо пропорциональны уровню ферментативной активности щелочной фосфатазы, которая, в свою очередь, прямо пропорциональна уровню активации транскрипционного фактора NF-κB в клетках.

Свежеприготовленный раствор субстрата (4-нитрофенилфосфат гексагидрат динатриевая соль) в SEAP-буфере (0,5 М NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 9,8) в концентрации 2 мг/мл вносили по 150 мкл в каждую лунку нового 96-луночного планшета. Затем из планшета с культурой клеток переносили 50 мкл среды в планшет с буфером для измерения активности SEAP. Сразу после переноса среды со всех образцов измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 405 нм (OD<sub>0</sub>, T<sub>0</sub>) с помощью спектрофотометра BioTek Synergy H1 ("BioTek", США). Далее планшет инкубировали при 37°C в течение 10–60 мин и измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм до достижения в положительном контроле значения оптической плотности 1,8 и выше (OD<sub>1</sub>, T<sub>1</sub>).

Активность щелочной фосфатазы рассчитывали по формуле:

$$EA = \frac{OD_1 - OD_0}{t_1 - t_0} \times \frac{K_p}{K_{ед}}$$

где EA — единицы активности, OD<sub>0</sub> — оптическая плотность при первом измерении, OD<sub>1</sub> — оптическая плотность при последнем измерении, t<sub>0</sub> — время первого измерения, t<sub>1</sub> — время последнего измерения, K<sub>p</sub> — коэффициент разведения среды в лунках, равный 20, K<sub>ед</sub> — коэффициент для 1 миллиединицы, определяемый как количество фосфатазы, которое гидролизует 1 пмоль 4-нитрофосфата в минуту, что соответствует 0,04 мЕд в мин.

*Измерение уровня экспрессии β-галактозидазы в культуре эукариотических клеток*

Клетки линий HEK293-hTLR4-CD14-MD2 и HEK293-NOD1 высевали в 96-луночный культуральный планшет из расчёта  $2,5 \times 10^4$  клеток на лунку (в 100 мкл культуральной среды). Через 24 ч инкубации (при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>) к клеткам вносили исследуемые образцы и контроли. Через 24 ч после внесения измеряли активность β-галактозидазы, экспрессия гена которой зависит от активации NF-κB/AP-1. Для этого отбирали культуральную среду из лунок планшета, а затем вносили буфер с субстратом для β-галактозидазы (1 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,25 М трис-HCl, pH 7,4; 0,02% NP40; 2 мг/мл *o*-нитрофенил-β-D-галактопиранозид). Уровень активности β-галактозидазы измеряли на спектрофотометре BioTek Synergy H1 при длине волны 405 нм по изменению степени окраски субстрата в лунках, не пересчитывая этот показатель в единицы активности.

Контролем, подтверждающим специфичность активации рецепторов, были клетки, не экспрессирующие TLR- и NOD-рецепторы, но содержащие в геноме репортерный ген SEAP (HEK293-null1-k) или ген β-галактозидазы (HEK293-null2).

*МТТ-тест*

Токсическое действие препаратов, которое может быть причиной неспецифической активации NF-κB и, как следствие, повышения уровня экспрессии β-галактозидазы или SEAP, определяли с использованием количественного колориметрического анализа для определения выживаемости клеток (МТТ-тест: 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид). Анализ выживаемости клеток проводили согласно стандартной методике по реакции восстановления бледно-жёлтого МТТ до сине-фиолетового формазана. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре, используя фильтры 540 нм и 620 нм. Результаты рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(OD_{540} - OD_{620})_{опытные}}{(OD_{540} - OD_{620})_{интактные}} \times 100,$$

где X — доля выживших клеток, %.

Достоверность различий между сравниваемыми величинами определяли в рамках непараметрической базовой статистики с использованием U-критерия Манна-Уитни. Различия рассматривались как значимые при  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Результаты исследования показали, что препараты в исследуемых концентрациях не оказывают влияния на контрольные линии клеток HEK293-null1-k и HEK293-null2, не экспрессирующие

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB

Таблица 1. Активация NF-κB/AP-1-зависимой SEAP в клетках линии HEK293-null1-k под воздействием белков OprF и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента, ЕА		
OprF+анатоксин	0,76±0,02 <i>p</i> =0,238	0,70±0,01 <i>p</i> =0,402	0,72±0,03 <i>p</i> =0,264
анатоксин	0,73±0,03 <i>p</i> =0,248	0,73±0,03 <i>p</i> =0,412	0,72±0,03 <i>p</i> =0,451
OprF	0,91±0,28 <i>p</i> =0,460	0,67±0,03 <i>p</i> =0,589	0,73±0,12 <i>p</i> =0,587
OprF+анатоксин, адсорбированные на Al(OH) <sub>3</sub>	0,70±0,04 <i>p</i> =0,531	0,74±0,08 <i>p</i> =0,481	0,70±0,07 <i>p</i> =0,556
анатоксин, адсорбированный на Al(OH) <sub>3</sub>	0,72±0,001 <i>p</i> =0,360	0,68±0,01 <i>p</i> =0,539	0,66±0,01 <i>p</i> =0,565
OprF, адсорбированный на Al(OH) <sub>3</sub>	0,67±0,01 <i>p</i> =0,505	0,74±0,11 <i>p</i> =0,530	0,64±0,03 <i>p</i> =0,752
К+ (TNF-α, 10 нг/мл)	9,11±0,10 <i>p</i> =0,007		
К- (без стимуляции)	0,60±0,24		

Таблица 2. Активация NF-κB/AP-1-зависимой β-галактозидазы в клетках линии HEK293-null2 при действии исследуемых препаратов

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента (OD <sub>405</sub> )		
OprF+анатоксин	1,84±0,16 <i>p</i> =0,643	1,86±0,04 <i>p</i> =0,439	1,82±0,02 <i>p</i> =0,919
анатоксин	1,84±0,01 <i>p</i> =0,719	1,86±0,04 <i>p</i> =0,674	1,81±0,03 <i>p</i> =0,991
OprF	1,71±0,10 <i>p</i> =0,220	1,79±0,01 <i>p</i> =0,804	1,81±0,06 <i>p</i> =0,920
OprF+анатоксин, адсорбированные на Al(OH) <sub>3</sub>	1,80±0,10 <i>p</i> =0,200	1,79±0,01 <i>p</i> =0,734	1,79±0,01 <i>p</i> =0,831
анатоксин, адсорбированный на Al(OH) <sub>3</sub>	1,70±0,05 <i>p</i> =0,482	1,82±0,03 <i>p</i> =0,911	1,78±0,02 <i>p</i> =0,648
OprF, адсорбированный на Al(OH) <sub>3</sub>	1,78±0,08 <i>p</i> =0,833	1,80±0,02 <i>p</i> =0,872	1,79±0,12 <i>p</i> =0,899
К+ (TNF-α, 10 нг/мл)	10±0,20 <i>p</i> =0,006		
К- (без стимуляции)	1,81±0,10		

TLR- и NOD-рецепторы, но содержащие гены SEAP или β-галактозидазы соответственно. При этом достоверность результатов подтверждается активацией ядерного фактора NF-κB при взаимодействии классического лиганда — TNF-α с собственным TNF-рецептором на поверхности клеток контрольных линий (табл. 1, 2).

Первым этапом работы было изучение действия препаратов на активацию NF-κB/AP-1 на клетках макрофагальной лейкемии мыши — Raw Blue, содержащих большое количество рецепторов распознавания паттерна и репортерный ген SEAP под контролем NF-κB и AP-1-зависимого промотора.

Анализ результатов показал (табл. 3), что все исследуемые препараты в концентрации 1:10 способствуют выраженной экспрессии NF-κB/AP-1-

зависимой SEAP по сравнению с контролем (0,97±0,03 ЕА), но не влияют на экспрессию NF-κB/AP-1 в концентрации 1:1000. Следует отметить, что OprF+анатоксин (1,34±0,11 ЕА; *p*=0,043), OprF (1,30±0,05 ЕА; *p*=0,000), OprF+анатоксин+гидроксид алюминия (1,84±0,07 ЕА; *p*=0,003), анатоксин+гидроксид алюминия (1,39±0,04 ЕА; *p*=0,005) и OprF+гидроксид алюминия (1,53±0,02 ЕА; *p*=0,001) обладают активностью и в концентрации 1:100. Наибольшим действием обладал комплекс двух белков OprF+анатоксин, адсорбированных на гидроксиде алюминия (увеличение в 1,9 раза).

Для подтверждения специфической активации ядерных факторов под действием препаратов исследовали их токсическое действие на клетки линии Raw Blue. Разведение 1:10 можно признать

Таблица 3. Активация NF-κB/AP-1-зависимой SEAP в клетках линии Raw Blue при действии исследуемых препаратов

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента, ЕА		
OpfF+анатоксин	5,6±0,37 p=0,003	1,34±0,11 (↑ в 1,38) p=0,043	0,85±0,01 p=0,007
анатоксин	4,69±0,22 p=0,002	1,06±0,07 p=0,270	0,82±0,04 p=0,001
OpfF	4,84±0,02 p=0,000	1,3±0,05 (↑ в 1,34) p=0,000	0,89±0,03 p=0,078
OpfF+анатоксин, адсорбированные на Al(OH) <sub>3</sub>	3,62±0,15 p=0,002	1,84±0,07 (↑ в 1,9) p=0,003	1,15±0,05 p=0,045
анатоксин, адсорбированный на Al(OH) <sub>3</sub>	2,56±0,11 p=0,002	1,39±0,04 p=0,005	0,96±0,05 p=0,719
OpfF, адсорбированный на Al(OH) <sub>3</sub>	1,90±0,03 p=0,000	1,53±0,02 (↑ в 1,58) p=0,001	0,94±0,19 p=0,822
К+ (TDB, 10 мкг/мл)	4,13±0,19 p=0,002		
К- (без стимуляции)	0,97±0,03		

Таблица 4. Определение токсического действия препаратов на выживаемость клеток линии Raw Blue, оцениваемой с использованием МТТ-теста

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Выживаемость клеток, %		
OpfF+анатоксин	33,1±0,71 p=0,005	56,8±0,63 p=0,014	109±12,8 p=0,250
анатоксин	44,4±0,7 p=0,008	92,4±0,07 p=0,926	135±3,46 p=0,013
OpfF	48,4±2,69 p=0,011	118±6,36 p=0,050	131±1,06 p=0,012
OpfF+анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	45,2±2,33 p=0,009	110±7,35 p=0,123	112±11,38 p=0,171
анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	44,6±0,78 p=0,008	64±5,30 p=0,036	92±7,14 p=0,899
OpfF+Al(OH) <sub>3</sub>	77,6±9,62 p=0,197	103±2,80 p=0,404	125±2,83 p=0,020
К- (интактные клетки)	93±6,08		

токсическим ввиду выраженного токсического действия всех препаратов (табл. 4), поэтому активирующее действие препаратов в этой дозе можно считать неспецифическим.

На следующем этапе оценивали воздействие препаратов на клетки, несущие определённые паттерн-распознающие рецепторы (табл. 5–8).

Препараты способствуют выраженной активации через TLR4 в токсической дозе 1:10. В разведении 1:100 данные достоверны только для анатоксина и анатоксина с гидроксидом алюминия.

В исследованных концентрациях выраженной активации при взаимодействии с TLR9 не выявлено, данные не достоверны.

При исследовании взаимодействия с рецептором NOD1 получены достоверные данные для белков OpfF, анатоксина и их сочетания в разведении 1:100,

при этом увеличение активации наиболее выражено у анатоксина. Действие OpfF+анатоксина и OpfF было отмечено и в разведении 1:1000. Белки в комплексе с гидроксидом алюминия активации NOD1 не вызывали.

Активация рецептора NOD2 исследованными препаратами не выявлена, данные не достоверны.

Врождённая иммунная система обеспечивает первую линию защиты от микробных патогенов и опосредуется фагоцитами, такими как макрофаги и дендритные клетки. Эти клетки распознают микробную инфекцию, поглощают патогены и вызывают воспалительные реакции. Активация этих клеток посредством стимуляции паттерн-распознающих рецепторов лигандами — начальный и очень важный этап иммунного ответа, определяющий дальнейшие его особенности и направленность [3].

## ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NF-κB

Таблица 5. Активация NF-κB/AP-1-зависимой β-галактозидазы в клетках линии HEK293-hTLR4-CD14/MD2 при действии исследуемых препаратов

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента (OD <sub>405</sub> )		
OpF+анатоксин	0,82±0,008 <i>p</i> =0,000	0,53±0,09 <i>p</i> =0,084	0,38±0,05 <i>p</i> =0,232
анатоксин	0,76±0,03 <i>p</i> =0,002	0,50±0,05 <i>p</i> =0,036	0,43±0,04 <i>p</i> =0,059
OpF	0,59±0,04 <i>p</i> =0,009	0,46±0,06 <i>p</i> =0,103	0,38±0,09 <i>p</i> =0,457
OpF+анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,85±0,04 <i>p</i> =0,004	0,42±0,04 <i>p</i> =0,089	0,39±0,03 <i>p</i> =0,087
анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,68±0,007 <i>p</i> =0,000	0,47±0,03 <i>p</i> =0,019	0,38±0,01 <i>p</i> =0,038
OpF+Al(OH) <sub>3</sub>	0,48±0,01 <i>p</i> =0,005	0,43±0,08 <i>p</i> =0,212	0,41±0,07 <i>p</i> =0,219
К+ (липополисахарид <i>E. coli</i> 1,0 мкг/мл)	0,83±0,004 <i>p</i> =0,002		
К- (без стимуляции)	0,33±0,001		

Таблица 6. Активация NF-κB/AP-1-зависимой SEAP в клетках линии HEK-TLR9 Blue при действии исследуемых препаратов

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента, ЕА		
OpF+анатоксин	0,99±0,01 <i>p</i> =0,074	0,83±0,01 <i>p</i> =0,497	0,72±0,16 <i>p</i> =0,759
анатоксин	0,78±0,003 <i>p</i> =1,000	0,81±0,04 <i>p</i> =0,718	0,87±0,02 <i>p</i> =0,291
OpF	0,96±0,02 <i>p</i> =0,104	0,80±0,02 <i>p</i> =0,782	0,76±0,005 <i>p</i> =0,771
OpF+анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,77±0,008 <i>p</i> =0,883	0,79±0,008 <i>p</i> =0,884	0,87±0,009 <i>p</i> =0,276
анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,99±0,008 <i>p</i> =0,074	0,85±0,08 <i>p</i> =0,556	0,80±0,07 <i>p</i> =0,848
OpF+Al(OH) <sub>3</sub>	0,81±0,05 <i>p</i> =0,738	0,83±0,06 <i>p</i> =0,597	0,93±0,07 <i>p</i> =0,245
К+ (ODN 2006, 1 мкг/мл)	2,05±0,32 <i>p</i> =0,050		
К- (без стимуляции)	0,78±0,06		

Клетки врождённого звена иммунной системы, такие как макрофаги, дендритные клетки и нейтрофилы, экспрессируют паттерн-распознающие рецепторы (PRR), способные обнаруживать консервативные микробные компоненты, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP), а также связанные с повреждениями молекулярные структуры (DAMP), которые представляют собой молекулы, выделяемые некротическими клетками и повреждёнными тканями. Клетки млекопитающих экспрессируют разнообразие PRR, которые в настоящее время по структурной гомологии принято разделять на пять семейств: TLR, RLR, NLR, CLR и ALR [15].

Различные семейства PRR имеют разные структурные свойства и отвечают на разные лиганды, но имеют много общего в нисходящих путях передачи сигнала. При этом происходит активация канонического пути NF-κB, который отвечает за транскрипционную индукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов и дополнительных медиаторов воспаления в различных типах врождённых иммунных клеток [4, 16–18].

Одними из важнейших множеств паттерн-распознающих рецепторов являются семейство toll-подобных рецепторов, представленное у человека 11 белками, которые инициируют внутриклеточные сигнальные каскады при воздействии определённых веществ, характерных для патогенных

Таблица 7. Активация NF-κB/AP-1-зависимой β-галактозидазы в клетках линии HEK293-NOD1 при действии исследуемых препаратов

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента (OD <sub>405</sub> )		
OpF+анатоксин	0,67±0,08 <i>p</i> =0,305	0,72±0,01 <i>p</i> =0,007	0,77±0,07 <i>p</i> =0,097
анатоксин	0,86±0,13 <i>p</i> =0,148	0,82±0,09 <i>p</i> =0,002	0,58±0,07 <i>p</i> =0,243
OpF	0,74±0,04 <i>p</i> =0,048	0,72±0,001 <i>p</i> =0,004	0,73±0,008 <i>p</i> =0,005
OpF+анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,72±0,06 <i>p</i> =0,119	0,72±0,16 <i>p</i> =0,423	0,52±0,13 <i>p</i> =0,788
анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,79±0,17 <i>p</i> =0,309	0,71±0,16 <i>p</i> =0,448	0,6±0,002 <i>p</i> =0,059
OpF+Al(OH) <sub>3</sub>	0,61±0,02 <i>p</i> =0,039	0,58±0,30 <i>p</i> =0,591	0,55±0,10 <i>p</i> =0,899
K+ (C12-iE DAP, 10 мкг/мл)	0,98±0,10 <i>p</i> =0,001		
K- (без стимуляции)	0,56±0,01		

Таблица 8. Активация NF-κB/AP-1-зависимой SEAP в клетках линии HEK293-NOD2 при действии исследуемых препаратов

Препараты	Разведения		
	1:10 (M±σ)	1:100 (M±σ)	1:1000 (M±σ)
	Активность фермента, ЕА		
OpF+анатоксин	0,65±0,05 <i>p</i> =0,685	0,66±0,08 <i>p</i> =0,843	0,66±0,08 <i>p</i> =0,843
анатоксин	0,71±0,02 <i>p</i> =0,571	0,81±0,002 <i>p</i> =0,083	0,68±0,002 <i>p</i> =1,000
OpF	0,79±0,006 <i>p</i> =0,112	0,67±0,01 <i>p</i> =0,831	0,66±0,008 <i>p</i> =0,672
OpF+анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,95±0,02 <i>p</i> =0,026	0,83±0,09 <i>p</i> =0,267	0,78±0,02 <i>p</i> =0,155
анатоксин+Al(OH) <sub>3</sub>	0,79±0,07 <i>p</i> =0,305	0,71±0,09 <i>p</i> =0,789	0,74±0,12 <i>p</i> =0,682
OpF+Al(OH) <sub>3</sub>	0,71±0,07 <i>p</i> =0,774	0,72±0,09 <i>p</i> =0,724	0,68±0,02 <i>p</i> =1,000
K+ (L18 MDP, 1 мкг/мл)	1,84±0,15 <i>p</i> =0,017		
K- (без стимуляции)	0,68±0,04		

микроорганизмов, и семейство NOD-подобных рецепторов, представленное у человека 23 белками, имеющими цитоплазматическую локализацию и распознающими ряд структурных мотивов патогенов; оно также играет роль в активации иммунных клеток [5, 17–20]. Различные семейства паттерн-распознающих рецепторов действуют синергично, функционально дополняя друг друга [3].

Изучение процессов активации клеток посредством паттерн-распознающих рецепторов и поиск лигандов, стимулирующих их — актуальная научная проблема. Появляются данные, показывающие, что один рецептор может стимулироваться различными отличающимися по структуре и происхождению

лигандами: например, для TLR4 ими являются не только липополисахариды, но и, на примере *P. aeruginosa*, некоторые белки её наружной мембраны, токсин ExoS, альгинат [2, 18].

В настоящей работе на примере клеточной линии макрофагальной лейкемии мыши было показано, что рекомбинантные белки синегнойной палочки способны активировать сигнальные пути NF-κB в миелоидных клетках, при этом добавление адьюванта гидроксида алюминия усиливало это действие.

Далее было исследовано их влияние на некоторые отдельные паттерн-распознающие рецепторы. В разведении (токсическом) 1:10 все исследованные

препараты активировали TLR4. Поскольку доза анатоксина была выше, чем OprF, нельзя сказать, какой из белков оказывал более сильное влияние. При этом влияние адсорбции этих белков на гидроксид алюминия не выявлено. В нетоксическом разведении 1:100 подобными свойствами обладал анатоксин, при этом адъювант — Al(OH)<sub>3</sub> — эти свойства не усиливал.

Также было отмечено стимулирующее влияние белков анатоксина, OprF и их сочетания на внутриклеточный рецептор NOD1, при этом аддитивного эффекта найдено не было. В адсорбированном на гидроксид алюминия виде эти белки не стимулировали NOD1, что может быть связано с тем, что адсорбция белков снижает их растворимость в воде, при этом клетки линии HEK293, будучи вследствие негематопоэтического происхождения нефагоцитирующими [21], не поглощают частицы Al(OH)<sub>3</sub> с адсорбированными белками. Интересно, что OprF и его сочетание с анатоксином были способны активировать NOD1 и в разведении 1:1000.

Стимуляции рецепторов TLR9 и NOD2 в настоящем исследовании выявлено не было. Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что белки *P. aeruginosa* способны активировать мембранный рецептор TLR4 и внутриклеточный рецептор NOD1.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках финансирования по госзаданию. Экспериментальная часть работы выполнена в Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Liu T., Zhang L., Joo D., Sun S.C. (2017) NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct. Target. Ther., **2**, 17023. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23
2. McIsaac S.M., Stadnyk A.W., Lin T.J. (2012) Toll-like receptors in the host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection and cystic fibrosis. J. Leukoc. Biol. Nov., **92**(5), 977-985. DOI: 10.1189/jlb.0811410
3. Paul W.E. (2008) Fundamental Immunology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 6th edition.

4. Takeuchi O, Akira S. (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. Cell, **140**(6), 805-820. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.022
5. Trindade B.C., Chen G.Y. (2020) NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases. Immunol. Rev., **297**(1), 139-161. DOI: 10.1111/imr.12902.
6. Palavutitotai N., Jitmuang A., Tongyai S., Kiratisin P., Angkasekwinai N. (2018) Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. PLoS One, **13**(2), e0193431. DOI: 10.1371/journal.pone.0193431
7. Killough M., Rodgers A.M., Ingram R.J. (2022) *Pseudomonas aeruginosa*: Recent advances in vaccine development. Vaccines (Basel), **10**(7), 1100. DOI: 10.3390/vaccines10071100
8. Rappuoli R., Siena E., Finco O. (2018) Will systems biology deliver its promise and contribute to the development of new or improved vaccines? Systems biology views of vaccine innate and adaptive immunity. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., **10**(8), a029256. DOI: 10.1101/cshperspect.a029256
9. Kumar S., Sunagar R., Gosselin E. (2019) Bacterial protein Toll-like-receptor agonists: A novel perspective on vaccine adjuvants. Front. Immunol., **10**, 1144. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01144
10. Исаков М.А., Солдатенкова А.С., Калошин А.А., Михайлова Н.А. (2011) Иммунобиологические свойства рекомбинантных атоксичных форм экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, **2**, 37-42. [Isakov M.A., Soldatenkova A.S., Kaloshin A.A., Mikhailova N.A. (2011) Immunobiological properties of recombinant atoxic forms of the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. Zhurnal Mikrobiologii i Epidemiologii i Immunobiologii, **2**, 37-42.]
11. Калошин А.А., Леонова Е.И., Солдатенкова А.В., Михайлова Н.А. (2016) Исследование протективных свойств рекомбинантного комплекса белка F наружной мембраны и анатоксина *Pseudomonas aeruginosa*. Вестник Российской академии медицинских наук, **71**(1), 5-10. [Kaloshin A.A., Leonova E.I., Soldatenkova A.V., Mikhailova N.A. (2016) Assessment of protective properties of the recombinant complex of the outer membrane protein F and the toxoid of *Pseudomonas aeruginosa*. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences, **71**(1), 5-10.]
12. Калошин А.А., Злыгостев С.А., Торопчина Ю.Н., Курбатова Е.А., Зверев В.В., Михайлова Н.А. (2005) Получение рекомбинантного белка F наружной мембраны (OprF) *Pseudomonas aeruginosa* и изучение его антигенных свойств. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, **5**, 50-53. [Kaloshin A.A., Zlygostev S.A., Toropchina Yu.N., Kurbatova E.A., Zverev V.V., Mikhailova N.A. (2005) Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* recombinant outer-membrane protein F and the study of its antigenic properties. Zhurnal Mikrobiologii i Epidemiologii i Immunobiologii, **5**, 50-53.]
13. Калошин А.А., Исаков М.А., Михайлова Н.А., Вертнев Ю.В. (2012) Получение рекомбинантной атоксической формы экзотоксина А *Pseudomonas aeruginosa*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **154**(9), 330-335. [Kaloshin A.A., Isakov M.A., Mikhailova N.A., Vertnev J.V. (2012) Preparation of recombinant atoxic form of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, **154**(3), 346-350. DOI: 10.1007/s10517-013-1947-1

14. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shcheblyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., Naroditsky B.S., Gudkov A.V., Gintsburg A.L., Logunov D.Y. (2013) Combined stimulation of Toll-like receptor 5 and NOD1 strongly potentiates activity of NF- $\kappa$ B, resulting in enhanced innate immune reactions and resistance to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infect. Immun.*, **81**(10), 3855-3864. DOI: 10.1128/IAI.00525-13
15. Brubaker S.W., Bonham K.S., Zanoni I., Kagan J.C. (2015) Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.*, **33**, 257-290. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
16. Areschoug T., Gordon S. (2008) Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib. Microbiol.*, **15**, 45-60. DOI: 10.1159/000135685
17. Kawai T., Akira S. (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.*, **21**(4), 317-337. DOI: 10.1093/intimm/dxp017
18. Kawai T., Akira S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, **34**(5), 637-650. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.006
19. Chen G., Shaw M.H., Kim Y.G., Nuñez G. (2009) NOD-like receptors: Role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.*, **4**, 365-398. DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239
20. Franchi L., Warner N., Viani K., Nuñez G. (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol. Rev.*, **227**(1), 106-128. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x
21. Licona-Limón I., Garay-Canales C.A., Muñoz-Paleta O., Ortega E. (2015) CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *J. Leukoc. Biol.*, **98**(1), 85-98. DOI: 10.1189/jlb.2A0914-458R

Поступила в редакцию: 26. 04. 2023.  
После доработки: 22. 05. 2023.  
Принята к печати: 22. 05. 2023.

## THE STUDY OF NF- $\kappa$ B TRANSCRIPTION FACTOR ACTIVATION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RECOMBINANT PROTEINS IN EUKARYOTIC CELL CULTURE

*E.O. Kalinichenko*<sup>1\*</sup>, *N.K. Akhmatova*<sup>1</sup>, *I.D. Makarenkova*<sup>2</sup>, *A.S. Erohova*<sup>3</sup>, *N.A. Mikhailova*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera,  
5a Malyi Kazenny per., Moscow, 105064 Russia; \*e-mail: eugeniuscallinicus@yandex.ru

<sup>2</sup>G.P. Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,  
1 Selskaya str., Vladivostok, 690087 Russia

<sup>3</sup>N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology,  
18 Gamalei str., Moscow, 123098 Russia

The transcription factor NF- $\kappa$ B is a key factor in the activation of immune responses; it is in turn activated by pattern recognition receptors, such as TLR and NLR receptors. The search for ligands activating innate immunity receptors is an important scientific problem due to the possibility of their use as adjuvants and immunomodulators. In this study the effect of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF proteins and a toxoid (a deletion atoxic form of exotoxin A) on the activation of TLR4, TLR9, NOD1, and NOD2 receptors has been investigated. The study was carried out using free and co-adsorbed on Al(OH)<sub>3</sub> *P. aeruginosa* proteins and eukaryotic cells encoding these receptors and having NF- $\kappa$ B-dependent reporter genes. The enzymes encoded by the reported genes are able to cleave the substrate with the formation of a colored product, the concentration of which indicates the degree of receptor activation. It was found that free and adsorbed forms of the toxoid were able to activate the TLR4 surface receptor for lipopolysaccharide. OprF and the toxoid activated the intracellular NOD1 receptor, but only in the free form. This may be due to the fact that the cell lines used were not able to phagocytize aluminum hydroxide particles with protein adsorbed on them.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; TLR; NOD; NF- $\kappa$ B; recombinant proteins

**Funding.** The work was carried out within the framework of financing under the state assignment.

Received: 26.04.2023; revised: 22.05.2023; accepted: 22.05.2023.