

УДК 571.27

# Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* PG – потенциальный блокатор активации Toll-подобных рецепторов 2 и 4

С. В. Зубова<sup>1\*</sup>, Я. В. Радзюкевич<sup>2</sup>, Н. И. Косякова<sup>3</sup>, И. Р. Прохоренко<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт биологического приборостроения РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия<sup>2</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия<sup>3</sup>Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, 142290 Россия

\*E-mail: zusvet@rambler.ru

Поступило в редакцию 06.11.2024

Принято к печати 28.01.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27555

**РЕФЕРАТ** TLR2 и TLR4 играют ключевую роль в развитии воспаления в ответ на бактериальную инфекцию. На клетках цельной крови человека исследовали действие липополисахарида (LPS) *Rhodobacter capsulatus* PG на активацию синтеза провоспалительных цитокинов агонистами рецепторов TLR2 и TLR4 LPS *Escherichia coli*, липотейхоевой кислотой (LTA) *Streptococcus pyogenes* или Pam3CSK4 (синтетическим аналогом бактериальных липопептидов). Показано, что LPS *R. capsulatus* PG проявляет антагонистические свойства в отношении исследуемых агонистов TLR2 и TLR4, блокируя синтез цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8. Предложены возможные механизмы блокирующего действия LPS *R. capsulatus* PG. LPS *R. capsulatus* PG может служить прототипом препаратов, защищающих как от грамотрицательных, так и от грамположительных бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** липополисахариды, *Rhodobacter capsulatus*, липотейхоевые кислоты, Pam3CSK4, TLR, CD14, цитокины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** KDO – 3-дезоксид-манно-октулозоновая кислота; LPS – липополисахарид; LTA – липотейхоевая кислота; IL – интерлейкин; MD-2 – белок миелоидной дифференцировки 2; Pam3CSK4 – синтетический триацилированный липопептид; PAMP – патогенраспознающие молекулярные паттерны; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ .

## ВВЕДЕНИЕ

Распознавание патогена клетками крови является наиболее важным шагом в развитии адекватного иммунного ответа на инфекцию. TLR2 и TLR4 играют ключевую роль при воспалении благодаря способности идентифицировать определенные консервативные молекулярные структуры вторгшихся патогенов (PAMP) [1]. Эти рецепторы также формируют и связывают врожденные и адаптивные иммунные реакции. Изучение механизмов функциональных ответов клеток врожденного иммунитета на PAMP различной природы важно для разработки эффективных способов противодействия бактериальным и вирусным инфекциям. TLR4 является специфическим рецептором LPS, основного компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий [2]. Лигандная

специфичность TLR2 контролируется их гетеродимеризацией с TLR1 или TLR6. Триацилированные липопептиды вызывают гетеродимеризацию TLR2 с TLR1, а в ответ на диацилированные липопептиды TLR2 взаимодействует с TLR6 и CD36 [3]. Из трех липидных цепей триацилированного лиганда (в частности, Pam3CSK4) две взаимодействуют с TLR2, тогда как третья цепь занимает гидрофобный канал TLR1 [4]. Поскольку в молекуле TLR6 гидрофобный канал отсутствует, гетеродимер TLR2/TLR6 не может распознавать триацилированные липопептиды [5]. Способность TLR2 кооперироваться либо с TLR1, либо с TLR6 приводит к взаимодействию клеток крови с более широким спектром микробных продуктов, увеличивает продукцию провоспалительных цитокинов и осложняет патогенез сепсиса.

LPS фототрофной бактерии штамма *Rhodobacter capsulatus* PG, обладающий собственной низкой эндотоксической активностью, является антагонистом эндотоксинов [6]. Синтетический аналог липида A *R. capsulatus*, препарат E5531, способен блокировать иммунобиологическую активность LPS и LTA [7].

Задача настоящей работы состояла в изучении способности LPS *R. capsulatus* PG блокировать активацию клеток врожденного иммунитета лигандами TLR2 и TLR4 разной природы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проведены на цельной крови условно здоровых добровольцев в возрасте от 25 до 30 лет. Все испытуемые дали письменное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования соответствует Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и одобрен Локальным этическим комитетом больницы Пущинского научного центра (№ 2 от 10.04.2014). Забор периферической крови осуществляли в клинических условиях с использованием вакутейнеров (Becton Dickinson and Company, Великобритания), обработанных гепарином натрия (17 ед./мл).

### Активация клеток крови LPS, LTA или Pam3CSK4

Для изучения влияния LPS, LTA и Pam3CSK4 на синтез цитокинов цельную кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1 : 10 и инкубировали с LPS *E. coli* O55:B5 (100 нг/мл), LTA *Streptococcus pyogenes* (1000 нг/мл), синтетическим липопептидом Pam3CSK4 (300 нг/мл) (Sigma-Aldrich, США) или LPS *R. capsulatus* PG (1000 нг/мл) в различных сочетаниях в течение 6 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. LPS *R. capsulatus* PG получен согласно методике, описанной ранее [8]. Для определения антагонистического действия LPS *R. capsulatus* PG в отношении агонистов кровь предварительно инкубировали в течение 30 мин с LPS *R. capsulatus* PG, после чего добавляли LPS, LTA или Pam3CSK4. После инкубации клетки крови осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин). Супернатанты отбирали и хранили при –20°C до определения содержания цитокинов.

### Содержание цитокинов

Содержание цитокинов определяли с помощью наборов для ИФА TNF-α, IL-6, IL-8 («Вектор-БЕСТ», Россия) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов определяли на ИФА-анализаторе STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 450 нм.

### Статистический анализ

Статистическую обработку и графическое представление результатов проводили методами непараметрической статистики в Origin Pro 7.5 и Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat). Результаты представлены в виде медианных значений с верхним и нижним квартилями (IQR). Статистическую значимость различий между медианными значениями определяли по критерию Манна–Уитни ( $p < 0.05$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Важнейшим звеном в цепочке активации синтеза цитокинов являются специфические рецепторы TLR2 и TLR4, обеспечивающие адекватный иммунный ответ на различные патогены. На клетках цельной крови человека в единой серии экспериментов исследовали активацию синтеза цитокинов TNF-α, IL-6 и хемокина IL-8 посредством лигандов TLR2 и TLR4: LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* или Pam3CSK4. Активирующие лиганды стимулировали выработку TNF-α, IL-6 и IL-8 клетками крови, достоверно превышающую контрольные значения (рис. 1).

В ответ на активацию LTA *S. pyogenes* наблюдалось повышение синтеза TNF-α и IL-8, концентрации которых были выше, чем при воздействии LPS *E. coli* или Pam3CSK4. Иными словами, количество синтезируемых клетками цитокинов снижалось в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *E. coli* > Pam3CSK4. LPS *R. capsulatus* PG в концентрации, превышающей концентрацию эндотоксина *E. coli* в 10 раз, Pam3CSK4 в 3 раза и в равной концентрации с LTA *S. pyogenes* не стимулировал выработку TNF-α в клетках (рис. 1).

Содержание IL-8 и IL-6 в крови в ответ на LPS *R. capsulatus* PG незначительно увеличивалось по сравнению с контролем, но было значительно ниже, чем при активации клеток крови другими лигандами.

Изучение способности LPS *R. capsulatus* PG защищать от действия LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* и Pam3CSK4 показало, что LPS *R. capsulatus* PG подавляет синтез TNF-α и IL-6 в крови, причем блокирование ответа снижалось в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *E. coli* > Pam3CSK4, как и при активации клеток крови исследованными лигандами. LPS *R. capsulatus* PG не защищал клетки крови от активации синтеза IL-8 посредством LPS *E. coli*, в отличие от активации посредством LTA *S. pyogenes* и Pam3CSK4. В этом случае защитный эффект LPS *R. capsulatus* PG был значительным.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе изучали потенциальную антагонистическую активность LPS непатогенной

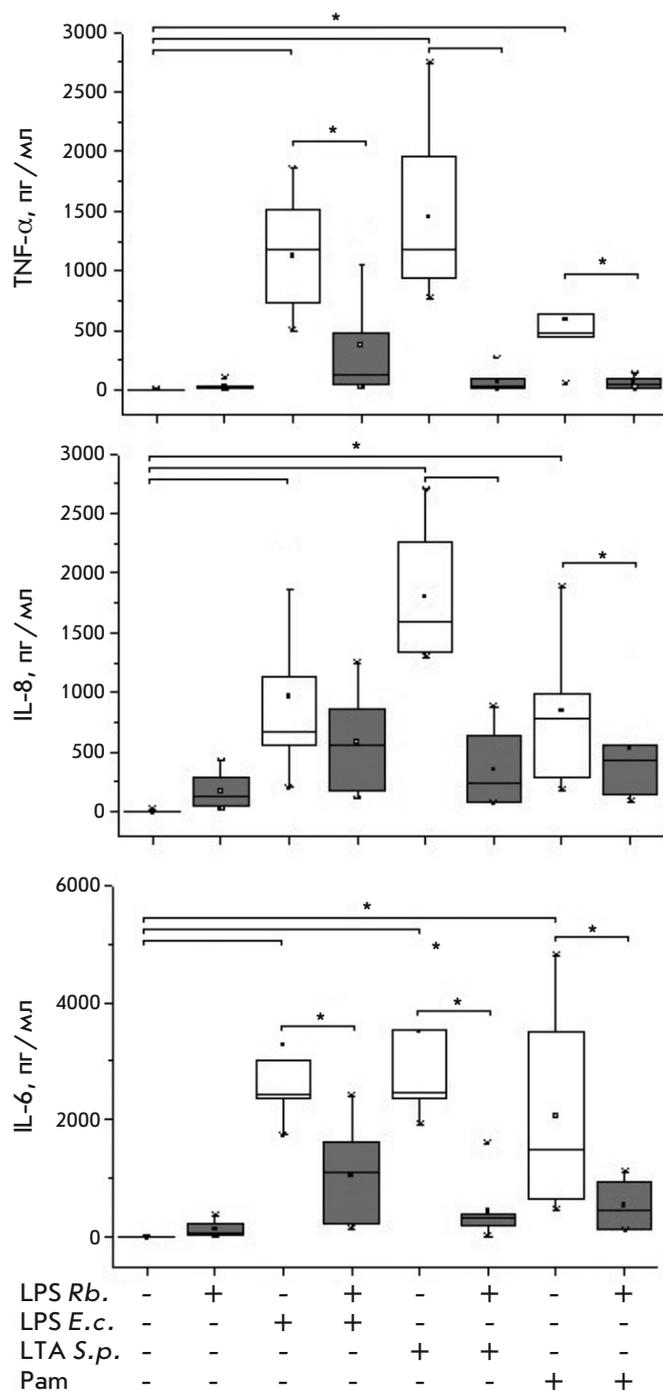


Рис. 1. Влияние LPS *R. capsulatus* PG на синтез TNF- $\alpha$ , IL-8 и IL-6 при активации клеток цельной крови LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* или Pam3CSK4, n = 7. \*p < 0.05

бактерии *R. capsulatus* PG не только в отношении LPS грамотрицательной бактерии *E. coli* – типичного агониста TLR4, но также ди- или триацелированных липопептидов – LTA грамположительной бактерии *S. pyogenes* и синтетического аналога триацелированных липопептидов, Pam3CSK4.

Эндотоксическая активность LPS зависит от структуры липида А. Наиболее значимый фактор, определяющий связь между структурой липида А и токсичностью LPS, количество жирных цепей. Ранее было показано, что E5531, синтетический аналог липида А фототрофной бактерии *R. capsulatus* 37b4, блокирует иммунобиологическую активность LPS *E. coli* и LTA *Staphylococcus faecalis* [7]. В отличие от E5531, LPS *R. capsulatus* PG содержит не только атипичный липид А с пятью укороченными жирными кислотами, в том числе одной ненасыщенной, но и включает в свою структуру 3-дезоксид-манно-октулозоновую кислоту (KDO), внешний кор и О-антиген. Установлено, что внутренний кор LPS влияет не только на биологическую активность, но также на взаимодействие с белком MD-2 и TLR4 [9]. Для распознавания LPS TLR4 образует димер с мембранным белком MD-2, который связывается с LPS, образуя комплекс, способный активировать TLR4-положительные клетки [2]. Показано, что липид А *R. sphaeroides* полностью заполняет гидрофобный карман MD-2, формируя комплекс MD-2/липид А, который удерживается главным образом за счет гидрофобного взаимодействия между хвостами липида А и аминокислотами полости связывания MD-2. Tyr102 может отвечать за антагонистическую активность этого липида А из-за его перевернутого встраивания в комплексе MD-2/липид А [10]. MD-2 также участвует в TLR2-опосредованных ответах клеток крови на компоненты клеточной стенки грамположительных бактерий. MD-2 связывается с TLR2, но эта связь слабее, чем с TLR4 [11].

Для распознавания три- или диацелированных липопептидов TLR2 образует рецепторные гетеродимеры с TLR1 или с TLR6 [12]. Известно, что атипичные LPS *Legionella pneumophila* или *Rhizobium* spp. индуцируют воспалительные ответы скорее через TLR2, чем через TLR4 [13]. В нашей работе установлено, что LPS *R. capsulatus* PG блокирует активацию синтеза цитокинов в клетках крови агонистами не только TLR4, но также TLR2/6 и TLR2/1. Это указывает на то, что из-за особенностей состава и структуры липида А LPS *R. capsulatus* PG может связываться не только с TLR4, но и с TLR2. По-видимому, в противоположность классическим агонистам, структура липида А *R. capsulatus* PG не стимулирует образование гомодимера (TLR4)<sub>2</sub> или комплексов TLR2/TLR1 и TLR2/TLR6, необходимых для активации клеток с последующим синтезом провоспалительных цитокинов. Возможно, LPS *R. capsulatus* образует комплекс TLR2/MD-2/LPS<sub>Rb</sub>, блокирующий формирование гетерокомплексов TLR2/6 или TLR2/1 и по-

следующую TLR2-опосредованную активацию клеток посредством LTA или Pam3CSK4 с повышением синтеза цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8.

В связи с тем, что LPS *R. capsulatus* PG блокирует активацию TLR4 и TLR2, нельзя исключить механизм его антагонистической активности, предложенный для LPS *Ochrobactrum intermedium* [14]. Этот низкотоксичный атипичный LPS при активации клеток крови индуцирует взаимодействие рецепторов TLR4 и TLR2 и образование гетеродимера TLR4/TLR2. Бактерии *R. capsulatus* PG и *O. intermedium* относятся к  $\alpha$ -подгруппе Proteobacteria [15]. LPS обеих бактерий обладают низкой эндотоксической активностью. В состав LPS этих бактерий входят липиды А, содержащие ненасыщенный жирнокислотный остаток, внутренний кор, внешний кор и О-антиген. Показано также, что сахара кора также участвуют в формировании низкоактивного комплекса TLR2/TLR4/MD-2 при ответе на LPS *O. intermedium* [14]. Нельзя исключить, что взятый в избытке LPS *R. capsulatus* PG также индуцирует формирование низкоактивного комплекса TLR4/MD-2/TLR2, который блокирует последующий синтез TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-8 в ответ на LPS *E. coli*, LTA *S. pyogenes* или Pam3CSK4.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует, что LPS *R. capsulatus* PG проявляет антагонистическую активность в отношении не только лигандов TLR4, но и лигандов TLR2 разной структуры, таких как три- и диацилированные липопептиды. Предложены возможные механизмы блокирующего действия LPS *R. capsulatus* PG в отношении активации TLR2 и TLR4.

LPS *R. capsulatus* PG может служить прототипом препаратов, защищающих как от грамотрицательных, так и от грамположительных бактерий. ●

*Авторы выражают благодарность  
Больнице Пуцинского научного центра РАН  
за сотрудничество.*

*Работа выполнена в рамках Госзадания  
1023033100509-9-1.6.7 и 122041200039-0, созданного  
Министерством науки и высшего образования  
Российской Федерации на базе Института  
биологического приборостроения и Института  
фундаментальных проблем биологии  
РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.*

*Авторы заявляют об отсутствии  
конфликта интересов.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mukherjee S., Karmakar S., Babu S.P.S. // *Braz. J. Infect. Dis.* 2016. V. 20. № 2. P. 193–204.
- Park B.S., Song D.H., Kim H.M., Choi B.-S., Lee H., Lee J.-O. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7242. P. 1191–1195.
- Hoebe K., Georgel P., Rutschmann S., Du X., Mudd S., Crozat K., Sovath S., Shamel L., Hartung T., Zähringer U., et al. // *Nature*. 2005. V. 433. № 7025. P. 523–527.
- Triantafilou M., Gamper F.G.J., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., Triantafilou K. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 41. P. 31002–31011.
- Maeshima N., Fernandez R.C. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013. V. 3. № 3. P. 1–13.
- Прохоренко И.П., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010.
- Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P., Rose J.R., Kobayashi S., Yokohama H., Ishibashi A., Christ W.J., Katayama K., Yamatsu I., et al. // *Br. J. Pharmacol.* 1999. V. 127. № 4. P. 853–862.
- Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.П. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32. № 4. С. 444–447.
- Prokhorenko I., Zubova S., Kabanov D., Grachev S. // *Crit. Care*. 2014. V. 18. № 2. P. 7–8.
- Anwar M.F., Panneerselvam S., Shah M., Choi S. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 7657. P. 1–11.
- Dziarski R., Wang Q., Miyake K., Gupta D. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 3. P. 1938–1944.
- Takeuchi O., Sato S., Horiuchi T., Hoshino K., Takeda K., Dong Z., Modlin R.L., Akira S. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. № 1. P. 10–14.
- Girard R., Pedron T., Uematsu S., Balloy V., Chignard M., Akira S., Chaby R. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. Pt 2. P. 93–302.
- Francisco S., Billod J.-M., Merino J., Punzon C., Gallego A., Arranz A., Martin-Santamaria S., Fresno M. // *Front. Immunol.* 2022. V. 12. № 748303. P. 1–12.
- Velasco J., Romero C., López-Goñi I., Leiva J., Díaz R., Moriyón I. // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1998. V. 48. Pt 3. P. 759–768.