

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *Helianthus tuberosus* L.

© 2016 г. Е.А. Генералов, А.И. Афремова

Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: generals1179@gmail.com, afremova.a@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.16 г.

Получены экспериментальные данные, свидетельствующие о наличии у изучаемого полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. иммуноадьювантной активности в модели антителообразующих клеток. Установлены основные рецепторы – Dectin-1 и TLR-6, необходимые для проявления полисахаридом его биологической активности в модели стимуляции фактора некроза опухоли TNF- α . Было показано, что рецептор CR3 в рассмотренной модели не принимает участие в распознавании полисахарида. С помощью обработки полисахарида из *Helianthus tuberosus* L. ферментами было доказано наличие β -(1 \rightarrow 4) и β -(1 \rightarrow 3)-гликозидных связей в молекуле полисахарида.

Ключевые слова: β -гликан, адьювантная активность, Dectin-1, CR3, TLR-6, полисахарид.

На поверхности клеток живых организмов находится разнообразное множество различных рецепторов, обладающих различными функциями. Одними из важнейших лигандов рецепторов являются моносахариды и их полимеры – олиго- и полисахариды. Зачастую такие рецепторы обладают защитными функциями и активируют иммунитет, что связано, по-видимому, с огромным количеством патогенов – РНК и ДНК вирусов, фрагментов мицелл, грибов, бактерий и других антигенов, в составе которых присутствуют последовательности моносахаридов. Чаще всего такие последовательности являются концевыми, что упрощает их распознавание клетками организма хозяина.

Одним из основных классов паттерн-распознающих рецепторов являются толл-подобные рецепторы (TLR). Семейство TLR-рецепторов содержит всего один трансмембранный фрагмент и при связывании с лигандом приводит к активации клеточного иммунного ответа. На сегодняшний день известно 13 членов этого семейства с различными лигандами и функциями.

Одним из интересующих нас TLR-рецепторов является рецептор TLR-6. Совместно с рецептором TLR-2 он формирует димеры и связывает зимозан – β -(1 \rightarrow 3)-глюкан. В то же

время основные лиганды комплекса TLR-2/TLR-6 представляют собой диациллипептиды и триациллипептиды. При этом связывание с TLR-2 приводит к активации внутриклеточного каскада по пути MyD88 и TRAF6. Эти адаптерные белки запускают сигнальный каскад по пути NF- κ B, что приводит к секреции провоспалительных цитокинов клетками. Помимо димеризации с TLR-2, TLR-6 способен образовывать комплекс с рецептором TLR-4, что приводит к взаимодействию с окисленным липопротеином низкой плотности (oxLDL). После связывания с ним комплекс интернализуется, что приводит к запуску продукции цитокинов CXCL1, CXCL2 и CCL9 по NF- κ B-пути, а цитокинов CCL5 и IL-1 β – через TICAM1-сигнальный путь [1,2].

Группа CR-рецепторов представляет собой мембранные гликопротеиды на поверхности иммунокомпетентных клеток. Они включают в свой состав комплементарные фрагменты к белкам системы комплемента. В то же время рецепторы этого семейства были обнаружены на поверхности мембран нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток и В-лимфоцитов. CR-рецепторы подразделяются на четыре типа, по виду связываемых лигандов: C1q, C3b, C4b (CR1); C3dg, iC3b (CR2); iC3b, iC4b (CR3); iC3b (CR4). На сегодняшний день возможность связывать полисахаридные молекулы была обнаружена только у CR3-рецептора. При этом лигандом к CR3 может быть только чистый

Сокращения: TLR – толл-подобные рецепторы, HTLR – полисахарид из *Helianthus tuberosus* L., АОК – антителообразующие клетки, LPS – липополисахарид, TNF – фактор некроза опухоли.

β -глюкан либо углеводов, включающий в свой состав β -глюкан.

CR3-рецептор принадлежит к семейству адгезионных интегринов. Структурно CR3 состоит из доменов CD11b и CD18 и обладает функцией адгезивной молекулы. CR3-рецептор имеет два сайта связывания, один расположен на С-конце и предназначен для β -глюканов, а второй – на N-конце и способен связывать фрагменты системы комплемента iC3b. При этом связывание iC3b зависит от концентрации ионов Mg^{2+} . Также CR3 содержит β -субъединицу с молекулярной массой 155 кДа и ион-зависимый металлсвязывающий сайт (MIDAS), который способствует лиганд-связыванию свободного рецептора [3].

Одним из сравнительно новых семейств рецепторов β -гликанов является кластер рецепторов Dectin-1, по имени одного из рецепторов этого кластера CLEC7A (Dectin-1). Данный кластер включает в себя семь различных рецепторов: Dectin-1, CLEC-9A, CLEC-2, MICL, MАН, CLEC-1, LOX-1.

Семейство рецепторов Dectin-1 представляет собой группу лектин-подобных рецепторов С-типа с общим доменом CTLD, который связан с внутриклеточным доменом трансмембранным стержнем. Рецепторы Dectin-1 содержат ITAM, ITIM и три кислотные последовательности (DED-мотивы) на внутриклеточной части рецептора, за счет чего и осуществляется многообразие сигнальных каскадов, проявляемое этим семейством рецепторов. На данный момент распределение рецепторов семейства Dectin-1 обнаружено на миелоидных клетках – макрофагах [4], нейтрофилах, дендритных клетках, которые являются основными в узнавании β -глюканов [5]. Вместе с тем CLEC7A-рецептор обнаружен и на поверхности трансформированных клеток, например, в клеточных линиях рака молочной железы [6].

Рецептор Dectin-1 (CLEC7A) представляет собой трансмембранный рецептор типа II. В его состав входят ITAM-мотив и внеклеточная лектин-подобная укладка С-типа. CLEC7A участвует в распознавании различных β -глюканов и является основным лейкоцитарным рецептором для узнавания бактерий, дрожжей, растений и грибов, а также их фрагментов. CLEC7A способен распознавать β -(1 \rightarrow 3)-глюканы с минимальным размером 9–10 моносахаридных звеньев. При этом усилению связывания способствуют боковые β -(1 \rightarrow 6)-связи, которые и сами могут выступать в качестве лиганда [7,8], микобактерии и эндогенные лиганды на поверхности Т-клеток, при этом значимыми для

связывания являются гистидин в положении 223 и триптофан в положении 221 [9]. При этом рецептор димеризуется, что приводит не только к передаче сигнала, но и к образованию еще одного сайта связывания глюканов. Лигандами являются также пока не установленные молекулы не глюканового, а гликанового происхождения.

При связывании с Dectin-1 лиганд активирует запуск различных клеточных ответов. Благодаря расположению рецептора преимущественно на поверхности мембран иммунокомпетентных клеток и способности связывать глюканы, зачастую входящие в состав инфекционных патогенов, рецептор участвует в иммунном ответе организма. Рецептор позволяет эффективно активировать противогрибковый T_H -1-зависимый иммунитет и еще 17 других различных ответов [10].

Внутриклеточная часть рецептора Dectin-1 включает в себя ITAM-подобный мотив – YXXH/LX7YXXL, особенностью которого является необязательность классического пути фосфорилирования для активации (при этом без ограничений на его использование). Для передачи внутриклеточного сигнала достаточно фосфорилирования Src-киназой только проксимально расположенного тирозина. Вследствие этого образуются сайты связывания для Syk-киназ, оба SH2-домена которых необходимы для передачи сигнала и димеризации мономеров CLEC7A [11]. В настоящий момент известно, что это один из немногих рецепторов (схожее действие у CLEC-2 и CLEC-9A), способный осуществлять сигнальные функции посредством только Syk-киназы. Дальнейшая передача сигнала идет посредством адаптерных белков CARD9 и MAP-киназ. Сигнальные каскады могут идти через PLC γ 2/Ca $^{2+}$, что приводит к активации PKC δ , контролирующую кальциейрин/NFAT-комплекс и ROS/NLRP3-инфламмосому, а также фосфорилирование CARD9-BCL10-Malt1. В свою очередь CARD9 может активировать NF- κ B. В дополнении к этому Syk может активировать NIK-киназу и ее сигнальный путь [12].

Помимо Syk-зависимого пути рецептор Dectin-1 осуществляет и Syk-независимый способ передачи сигнала через DED-мотив и Ras, с активацией Raf-1, и неканонический – NF- κ B, который, к примеру, регулирует фагоцитоз макрофагов. На рис. 1 изображены внутриклеточные сигнальные каскады, активируемые после лиганд-связывания Dectin-1.

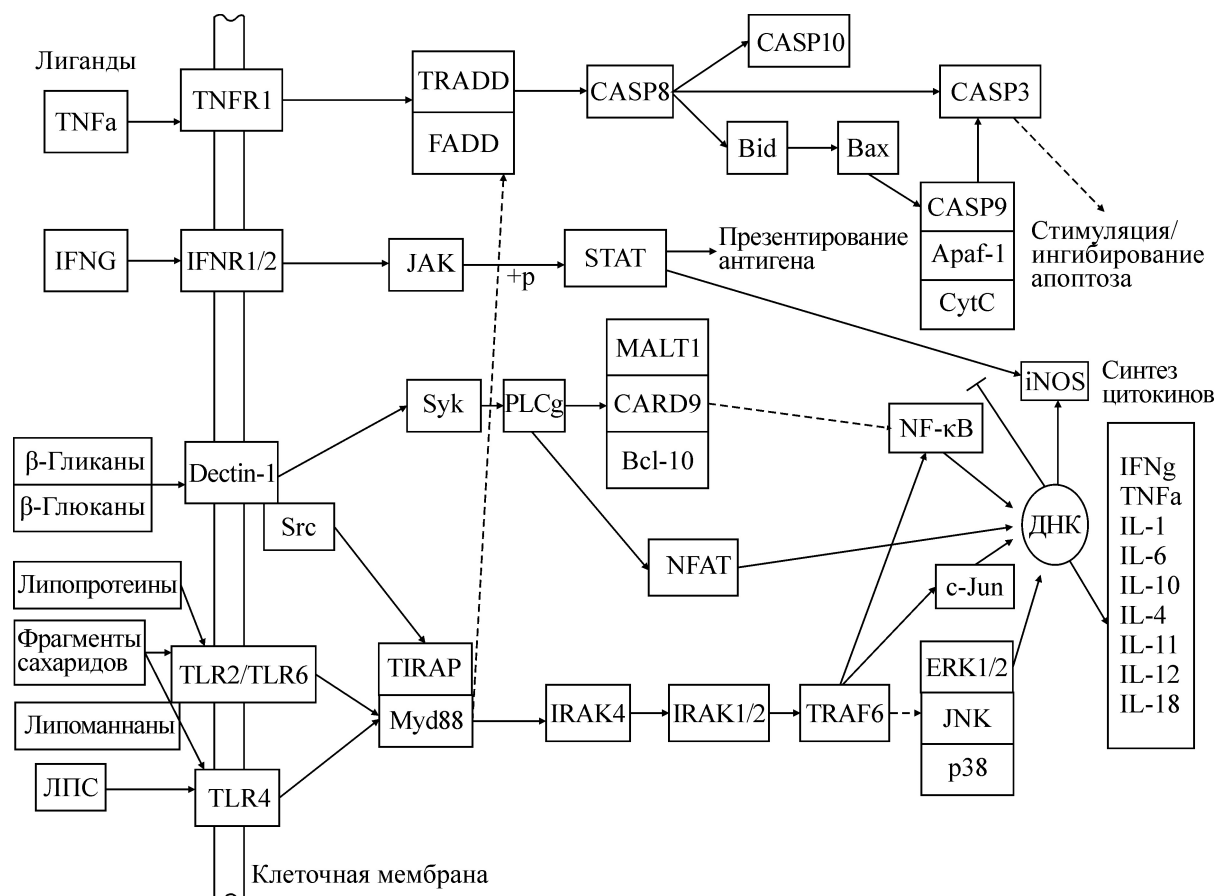


Рис. 1. Сигнальные пути Dectin-1, TLR-6, TNFR, IFNR (модифицирована первоначальная схема из [12]).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проведенном исследовании использовали β -гликан НТLP, полисахарид из *Helianthus tuberosus* L., выделенный в лаборатории PolyLab Pte Ltd (Сингапур).

Использованные клеточные культуры были любезно предоставлены лабораторией пролиферации клеток Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.

Экспериментальные лабораторные животные были приобретены в питомнике «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий РАМН.

Обработка ферментами. Были использованы растворы полисахарида различной концентрации (0,001, 0,01, 0,1 и 1,0 мг/мл), которые обрабатывали литиказой из *Arthrobacter Luteus* (cat. No SRE0018, Sigma-Aldrich, США), специфичной к β -(1 \rightarrow 3)-гликозидным связям, и целлюлазой, специфичной к β -(1 \rightarrow 4)- и в некоторой степени к β -(1 \rightarrow 3)-гликозидной связи (cat. No MFCD00081510, Sigma-Aldrich, США). В каче-

стве базовой использовали методику Стоуна и Кларка [13].

Целлюлаза из *Aspergillus niger* (cat. No C1184, Sigma-Aldrich, США) [1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan-4-глюканогидролаза] катализирует гидролиз эндо-1,4-бета-D-гликозидной связи в целлюлозе, лихенане, глюкане ячменя и целлогексаозе; не расщепляет целлобиозу или р-нитрофенил- β -D-глюкозид. Реакционная смесь – 0,1 М цитрат-фосфатный буфер, pH 5,0, при 37°C в течение 2 ч.

Литиказа из *Arthrobacter Luteus* гидролизует полимеры глюкозы с β -(1 \rightarrow 3)-типом связей. Реакцию осуществляли в 67 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,5, при 25°C в течение 30 мин.

Гидролитическое расщепление осуществляли при весовом отношении полисахарида к ферменту, равном 100:1. Реакцию останавливали 30-минутным прогреванием реакционной смеси при 60°C. Биологическую активность проверяли на модели стимуляции антителообразующих клеток (АОК) после остановки реакции

Стимуляция антителообразующих клеток в селезенках мышей. Проверяли влияние различ-

ных доз HTLP на количество антителообразующих клеток при внутрибрюшинном введении эритроцитов барана и растворов разных концентраций полисахарида мышам линии F₁(СВАхС57В1). Для оценки влияние на количество АОК использовали метод Эрне–Нордина. Оценку производили на четвертые сутки после иммунизации.

Эритроциты дефибринированной крови барана трижды отмывали, центрифугируя в 50-кратном объеме раствора Хенкса (кат. № P025п, ПанЭко, Россия), затем ресуспендировали в том же растворе. Контрольным мышам вводили эритроциты барана в количестве 2×10^6 кл., а опытным – совместно эритроциты барана (2×10^6 кл.) + полисахарид (1, 10, 100 и 1000 мкг/мышь), внутрибрюшинно.

Инактивация генов целевых рецепторов. Были синтезированы олигонуклеотидные последовательности, комплементарные фрагментам целевых рецепторов:

ITGB2 (CR3)

ITGB2, sh1dir1 –

5'-phospho-gatccgCCTACTATAAACTCTCC
TCTACACGTGTAGAGGAGAGTTTATAG
TAGGtttttITGB2, sh1rev1 –

5'-phospho-aattcaaaaaCCTACTATAAACTCTC
CTCTACACGTGTAGAGGAGAGTTTATAG
TAGGcg;

CLEC7A (Dectin-1)

CLEC7A, sh2dir1 –

5'-phospho-gatccgGCGACACAATTCAGGGA
GAAACACGTGTTTCTCCCTGAATTGTGT
CGCttttg,

CLEC7A, sh2rev1 –

5'-phospho-aattcaaaaaGCGACACAATTCAGG
GAGAAACACGTGTTTCTCCCTGAATTGT
GTCCGcg;

TLR-6

TLR-6, sh3dir1 –

5'-phospho-gatccgCACAGAGGTCCAACSTT
ATTCACGTGAATAAGGTTGGACCTCTGG
TGtttttTLR-6, sh3rev1 –

5'-phospho-aattcaaaaaCACAGAGGTCCAAC
STTATTCACGTGAATAAGGTTGGACCTC
TGTTGcg.

Олигонуклеотиды попарно отжигались, а затем были заклонированы в лентевирусный

плазмидный вектор pLSLP по соответствующим сайтам рестрикции.

Для получения рекомбинантного лентивируса использовали клетки HEK293T, которые котрансфицировались плазмидами pRSV-Rev, pMDLg/pRRE (ген/вставка HIV-1 GAG/POL), pCerulean-VSVG и плазмидой, несущей shRNA гена интереса.

Клетки HEK293T культивировали в 9-сантиметровой чашке Петри до плотности пересева 50–70%, на среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (cat. No F2442, Sigma-Aldrich, США) и антибиотиками (пенициллин и стрептомицин). После этого клетки однократно промывали фосфатно-солевым буфером и наносили на них трансфекционную смесь – упаковочные плазмиды с целевой, на одну точку – 4 мкг pRSV-Rev, 2 мкг pMDLg/pRRE, 1 мкг pCerulean-VSVG, 1,3 мкг плазмиды интереса. Добавляли смесь 150 мкл OPTIMEM с 3 мкл Plus Reagent. Через 5 мин добавляли смесь 150 мкл OPTIMEM с 6 мкл липофектамина. Все перемешивания производили посредством плавного пипетирования. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 40–50 мин.

Далее клетки инкубировали 6 ч в CO₂-инкубаторе, затем однократно промывали фосфатно-солевым буфером, а среду заменяли свежей средой DMEM с 5% эмбриональной телячьей сыворотки. Первый вирусный супернатант собирали через 24 ч и фильтровали в пробирки через фильтр-насадку с проницаемостью пор 0,45 мкм. Клетки вновь заливали свежей средой с добавлением 2% сыворотки по объему. В дальнейшем сбор вирусного супернатанта проводили несколько раз с интервалом 12 ч. Супернатанты объединяли. Осаждение вирионов проводили с 12%-м полиэтиленгликолем при 4°C в течение 12 ч, центрифугировали при 5000 об/мин. Очищенные супернатанты хранили либо на льду (до двух недель), либо в кельвинаторе (при температуре –70°C).

Заражение и селекцию клеток RAW 264.7 проводили следующим образом. Нарращивали нативные клетки до 60–80% плотности пересева. Вирусные стоки объединяли (все по VFP, все по CLEC7A и т.д.). Добавляли 1 мл вирусного концентрата с титром 10⁸/мл, разведенного сывороткой в соотношении 1:2, на чашки с посеянными клетками. Добавляли полибрен до конечной концентрации 5 мкг/мл. Инкубировали в CO₂-инкубаторе двое суток. Затем клетки рассаживали с добавлением среды и через сутки добавляли пурамицин (cat. No P9620, Sigma-Aldrich, США) до концентрации 1 мкг/мл. Инкубировали клетки в инкубаторе 2 сут. Меняли

Таблица 1. Влияние НТЛР на продукцию TNF- α клеточной линии RAW 264.7

№	Группа	TNF- α в культуральной жидкости после 4 ч инкубации, пкг/мл	TNF- α в культуральной жидкости после 24 ч инкубации, пкг/мл
1	Контроль (физиологический раствор)	3,18 \pm 1,11	16,21 \pm 7,06
2	Опыт (НТЛР, 100 мкг/мл)	83,13 \pm 7,34*	129,5 \pm 11,87*
3	LPS (физиологический раствор)	100,49 \pm 9,54*	131,85 \pm 13,20*

Примечание. * – Достоверное различие с контролем (критерий Манна–Уитни) ($p < 0,05$).

среду и добавляли пуромицин – 2 мкг/мл. Селекцию вели 1–2 недели или до вымирания контроля. Выросшие до 60–80% плотности пересева отселекционированные колонии отбирали и высевали на пластик. Проверку выключения рецепторов проводили по свечению метки в геномном конструкте RFP, GFP и BFP (контрольные плазмиды, трансфицированные параллельно с целевыми). Эффективность лентивирусной трансфекции составляла около 80%. В дальнейшем клетки активировали с помощью липополисахарида (LPS) и НТЛР и тестировали на выработку фактора некроза опухоли TNF- α .

Посадка антител anti-TLR-6, anti-CR3, anti-Dectin-1 на клетки RAW 264.7. Клетки RAW 264.7 отмывали дважды FACS-окрашивающим буфером (фосфатно-солевым буфером, содержащим 1% FCS и 0,1% NaN₃). Супернатант отбирали и добавляли первичные антитела anti-TLR-6, anti-CR3, anti-Dectin-1 (Novus NB100-56536, ebioscience 14-0112-85 и biovision 3891-100 соответственно), разведенные в среде без добавления эмбриональной телячьей сыворотки, инкубировали с ними 30 мин при 4°C без доступа света. Концентрация антител к CR3 – 1 мкг/мл, TLR-6 – 4 мкг/мл и Dectin-1 – 4 мкг/мл [14]. В дальнейшем клетки активировали с помощью LPS и НТЛР и тестировали на выработку TNF- α .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Совместная обработка ферментами литиказой из *Arthrobacter Luteus*, специфичной к β -(1 \rightarrow 3)-гликозидным связям, и целлюлазой из *Aspergillus niger*, специфичной к β -(1 \rightarrow 4)- и в некоторой степени к β -(1 \rightarrow 3)-гликозидным связям, приводила к практически полной потере активности полисахаридной фракции в модели стимуляции антителообразующих клеток.

Стимуляция антителообразующих клеток в селезенках мышей после введения НТЛР, обработанного литиказой и целлюлазой. Совместная ферментная обработка приводила к практиче-

ски полной потере иммуноадекватной активности НТЛР, что выражалось в неотличимых (в пределах погрешности) значениях от контроля. Были получены следующие данные: после обработки литиказой (1, 10, 100 и 1000 γ /мышь) гидролизат НТЛР показал 59 \pm 6, 62 \pm 6, 68 \pm 7, 75 \pm 8 АОК соответственно, а контроль – 65 \pm 7 АОК. Аналогично, после обработки целлюлазой (1, 10, 100 и 1000 γ /мышь) количество АОК составило 82 \pm 8, 85 \pm 9, 104 \pm 12, 115 \pm 12 соответственно, против – 83 \pm 9 АОК в контроле. Предполагается, что немного повышенный уровень стимуляции, скорее всего, обусловлен влиянием недогидрализованных мономеров полисахарида, как образцов патогенности, на клетки иммунной системы, которые распознают их и секретируют цитокины, активирующие пролиферацию спленоцитов. При этом полисахарид без обработки ферментами в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкг/мышь продемонстрировал стимуляцию количества АОК: 200 \pm 16, 502 \pm 75, 743 \pm 80 и 927 \pm 94 АОК соответственно.

В то же время в модели стимуляции фактора некроза опухоли TNF- α в клеточной среде RAW 264.7 полисахарид НТЛР продемонстрировал стимуляцию выработки цитокина. При этом стимуляция полисахаридом была несколько слабее, чем стимуляция выработки цитокина липополисахаридом, который в свою очередь статистически значимо отличается от контроля (табл. 1). Полученные данные воспроизводятся через 4 и 24 ч инкубации культуры клеток с НТЛР, LPS и физиологическим раствором.

Для изучения молекулярного механизма действия НТЛР изучали возможность вовлечения рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 в активацию клеток полисахаридом. Исследовали влияние генных конструктов на способность НТЛР стимулировать выработку TNF- α макрофагальными клетками RAW 264.7 после 4 ч инкубации (табл. 2) и после 24 ч инкубации (табл. 3).

Таблица 2. Влияние HTLP и LPS на продукцию TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 после 4 ч инкубации

№	Группа	TNF- α в культуральной жидкости, пкг/мл
1	Контроль – физиологический раствор	4,47 \pm 1,56
2	Дектин-1 (физиологический раствор)	6,57 \pm 1,00
3	CR3 (физиологический раствор)	6,92 \pm 2,12
4	TLR-6 (физиологический раствор)	4,44 \pm 2,6
5	LPS (физиологический раствор)	103,66 \pm 9,60*
6	LPS – Дектин-1 (физиологический раствор)	63,03 \pm 6,42*
7	LPS – CR3 (физиологический раствор)	57,36 \pm 5,56*
8	LPS – TLR-6 (физиологический раствор)	70,88 \pm 7,12*
9	Опыт (HTLP, 100 мкг/мл)	81,71 \pm 7,82*
10	Дектин-1 (HTLP, 100 мкг/мл)	10,03 \pm 3,84
11	CR3 (HTLP, 100 мкг/мл)	69,78 \pm 7,02*
12	TLR-6 (HTLP, 100 мкг/мл)	10,53 \pm 2,56

Примечание. * – Достоверное различие с контролем (критерий Манна–Уитни) ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние HTLP на продукцию TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 после 24 ч инкубации

	Группа	TNF- α в культуральной жидкости, пкг/мл
1	Контроль – физиологический раствор	18,02 \pm 7,56
2	Дектин-1 (физиологический раствор)	21,00 \pm 8,00
3	CR3 (физиологический раствор)	15,88 \pm 6,6
4	TLR-6 (физиологический раствор)	13,65 \pm 6,56
5	LPS (физиологический раствор)	131,85 \pm 13,20*
6	LPS – Дектин-1 (физиологический раствор)	120,78 \pm 12,06*
7	LPS – CR3 (физиологический раствор)	123,08 \pm 10,89*
8	LPS – TLR-6 (физиологический раствор)	129,82 \pm 12,6*
9	Опыт (HTLP, 100 мкл/мл)	133,80 \pm 13,80*
10	Дектин-1 (HTLP, 100 мкл/мл)	26,70 \pm 7,60
11	CR3 (HTLP, 100 мкл/мл)	124,32 \pm 12,60*
12	TLR-6 (HTLP, 100 мкл/мл)	28,73 \pm 9,63

Примечание. * – Достоверное различие с контролем (критерий Манна–Уитни) ($p < 0,05$).

Инактивация генов целевых рецепторов и продукция TNF- α . Полученные данные позволяют утверждать (табл. 2 и 3, рис. 1 и 2), что HTLP, как и LPS, является стимулятором выработки TNF- α . В сравнении с контролем уровень выработки увеличился через 4 ч в 18,3 раза в случае HTLP и в 23,2 раза в случае LPS, а через 24 ч – в 7,4 и 7,3 раза соответственно. Контрольные значения TNF- α в культурах с единичными выключенными рецепторами в пределах погрешности не отличались от кон-

троля без выключенных рецепторов. В свою очередь HTLP не стимулирует выработку TNF- α в культурах с выключенными генами рецепторов TLR-6 и Dectin-1 в пределах погрешности, что может свидетельствовать о том, что для HTLP необходимы оба рецептора для корректной активации клеток и выработки TNF- α . Учитывая значительную молекулярную массу HTLP (1–2 МДа), можно предположить, что активация происходит путем одновременного связывания обоих рецепторов, что обуславли-

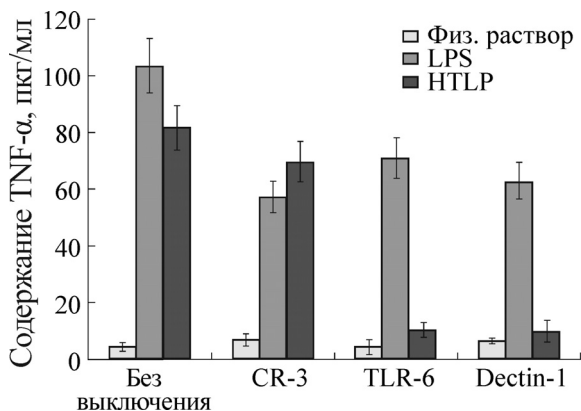


Рис. 2. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через 4 ч инкубации.

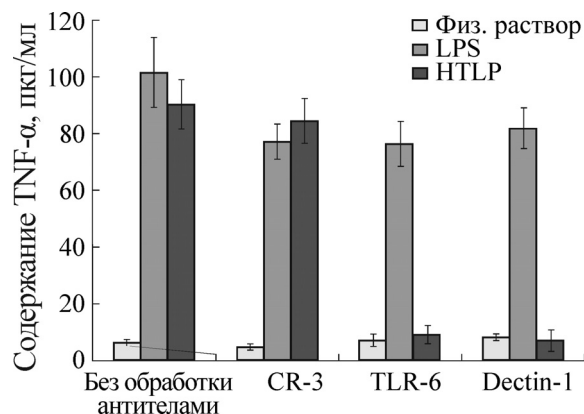


Рис. 4. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF- α клеточной линии RAW 264.7 после инактивации моноклональными антителами целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 через 4 ч инкубации.

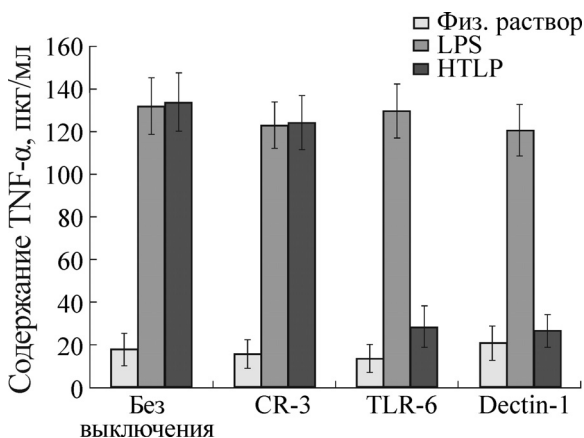


Рис. 3. Диаграмма сравнений уровней выработки TNF- α клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через 24 ч инкубации.

вает действие HTLP на клеточные системы и организм.

Блокирование рецепторов антителами и продукция TNF- α . Другая модель проверки молекулярного механизма действия HTLP – инактивация целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 высокоспецифичными моноклональными антителами. Полученные данные приведены в табл. 4 и проиллюстрированы на рис. 4.

Результаты в модели антительной обработки воспроизводят данные, полученные в модели трансфекционного выключения генов целевых рецепторов, и демонстрируют, что HTLP стимулирует выработку TNF- α . Более того, уровень стимуляции выработки цитокина сравним с уровнем стимуляции липополисахаридом. LPS является ярко выраженным стимулятором вы-

работки TNF- α , что известно из литературных и экспериментальных данных. Вместе с тем было установлено, что оба рецептора (Dectin-1 и TLR-6) необходимы HTLP для реализации своей биологической активности.

Полученные данные в двух различных моделях – инактивации генов целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 макрофагов и блокирования их моноклональными антителами – однозначно свидетельствуют об участии двух рецепторов (Dectin-1 и TLR-6) в активации макрофагальных клеток RAW 264.7 при помощи полисахарида HTLP. Поскольку в контроле уровень синтеза цитокина TNF- α статистически не отличим от уровня выработки TNF- α в моделях именно с инактивированными Dectin-1 и TLR-6, то можно сделать вывод, что выключение генов хотя бы одного рецептора (или антительная блокировка) приводит к потере биологической активности HTLP. В свою очередь это означает необходимость взаимодействия с обоими рецепторами для корректной активации клеток полисахаридом HTLP.

Остается дискуссионным вопрос о способах взаимодействия HTLP с рецепторами Dectin-1 и TLR-6. На наш взгляд возможны несколько способов взаимодействия.

Во-первых, возможно прямое связывание HTLP сразу с двумя рецепторами. Большая молекулярная масса HTLP (1–2 МДа) позволяет активировать клетку путем связывания двух рецепторов, что приводит к запуску двух сигнальных каскадов, которые обладают эффектом синергизма при участии транскрипционного фактора NF- κ B. Активация NF- κ B в случае Dectin-1 происходит при участии Src, Syk и

Таблица 4. Влияние HTLP на продукцию TNF- α после 4 ч инкубации при антительном блокировании рецепторов

№	Группа	TNF- α в культуральной жидкости (M \pm SD), пкг/мл
1	Контроль – физиологический раствор	6,47 \pm 1,16
2	Дектин-1 (физиологический раствор)	8,32 \pm 1,21
3	CR3 (физиологический раствор)	4,88 \pm 1,07
4	TLR-6 (физиологический раствор)	7,25 \pm 2,23
5	LPS (физиологический раствор)	101,81 \pm 11,32*
6	LPS – Дектин-1 (физиологический раствор)	72,10 \pm 7,19*
7	LPS – CR3 (физиологический раствор)	77,36 \pm 6,31*
8	LPS – TLR-6 (физиологический раствор)	76,51 \pm 8,01*
9	Опыт (HTLP, 100 мкг/мл)	90,52 \pm 8,69*
10	Дектин-1 (HTLP, 100 мкг/мл)	7,13 \pm 3,74
11	CR3 (HTLP, 100 мкг/мл)	84,73 \pm 7,91*
12	TLR-6 (HTLP, 100 мкг/мл)	9,22 \pm 3,22

Примечание. * – Достоверное различие с контролем (критерий Манна–Уитни) ($p < 0,05$).

CARD9-MALT1-Bcl-10. TLR-6, скорее всего, не участвует в связывании с полисахаридом отдельно от TLR-2, что показано в нескольких работах [15,16]. Рецепторный комплекс TLR-6/TLR-2, взаимодействуя с HTLP, также приводит к передаче сигнала по NF- κ B пути опосредованно через TIRAP-Myd88, IRAK4, IRAK1/2 и TRAF6 (рис. 1).

Во-вторых, необходимо рассмотреть возможность первичного связывания только с одним из данных рецепторов. Данное событие приводит к димеризации рецепторов или вторичному связыванию с другим рецептором (или рецепторами). При этом первичное связывание, наиболее вероятно, происходит с рецептором Dectin-1, а не TLR-6, по той причине, что активация комплекса TLR-6/TLR-2 приводит к запуску проапоптотического каскада по CASP8-пути, что должно приводить к гибели клеток. Тем не менее гибель клеток в модели колоние-стимулирующей активности не наблюдается, наоборот, HTLP является колониестимулятором, что связано с совместной активацией TLR-6 полисахаридом и TNF-R1 – лигандом. Такое взаимодействие приводит к смещению внутриклеточного сигнального пути в сторону проапоптотического сигнального каскада TRADD посредством TIRAP-Myd88 и мобилизации RIPK и TRAF2. Вместе с тем следует отметить, что инфламасомный способ активации макрофагов, изучаемый в настоящее время [17], скорее всего, не происходит в силу того, что CR3-рецептор не участвует в процессе стимуляции выработки TNF- α . Последняя, в свою

очередь, взаимодействует с протеинкиназой IKK, что позволяет серин-треониновой киназе RIPK активировать NF- κ B. Белок I κ B α , находящийся в комплексе с NF- κ B, ингибирует его транслокацию, происходит фосфорилирование IKK и последующая деградация с высвобождением NF- κ B, который транслоцируется к ядру и опосредует транскрипцию множества белков, участвующих в выживании и пролиферации клеток, воспалительной реакции и антиапоптотических факторов. В дополнение к этому TNF- α может запускать повышенную пролиферацию клеток по сигнальному пути JNK с активацией AP-1. Однако если учитывать совместную активацию TLR-6 и Dectin-1, скорее всего активация идет по NF- κ B сигнальному пути (рис. 1).

В-третьих, существует вероятность существования некоего стороннего рецептора, который связывает HTLP первым, однако без рецепторов Dectin-1 и TLR-6 не происходит передачи внутриклеточного сигнала. В свою очередь авторы считают, что четырехкомпонентная система активации клеток даже молекулой с большой молекулярной массой представляется маловероятной в силу того, что многокомпонентные системы более подвержены влиянию внешних сил и менее устойчивы. С другой стороны учитывая скорость наработки TNF- α (4 ч) и скорость миграции рецепторов на примере T-клеток с одного полюса клетки к другому (3,6–18 мкм/ч) [18], можно предположить, что происходит быстрая активация клетки полисахаридом, после чего комплекс «полисахарид-

рид–рецепторы» распадается и молекула полисахарида постепенно деградирует в растворе.

ВЫВОДЫ

1. Полисахарид из *Helianthus tuberosus* L. является β -гликаном с β -(1→3)- и β -(1→4)-связями.

2. Полисахарид из *Helianthus tuberosus* L. обладает иммуноадьювантной активностью в модели стимуляции АОК.

3. Для проявления биологической активности полисахарид из *Helianthus tuberosus* L. необходимо взаимодействие с двумя рецепторами Dectin-1 и TLR-6, но не с CR3.

Авторы выражают сердечную благодарность д.б.н., проф. П.М. Чумакову за содействие в работе и ценные наставления. Авторы глубоко признательны В.С. Прасолову за помощь в работе. Авторы также признательны к.ф.-м.н. Н.Г. Есиповой за советы и ценный опыт в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Bulut, E. Faure, L. Thomas, et al., J. Immunol. **167** (2), 987 (2001).
2. Н. Д. Титова, Иммунопатология, аллергология, инфектология **3**, 32 (2009).
3. Y. Xia, V. Vetvicka, J. Yan, et al., J. Immunol. **162** (4), 2281 (1999).
4. G. D. Brown, P. R. Taylor, D. M. Reid, et al., J. Exp. Med. **196** (3), 407 (2002).
5. A. M. Kerrigan and G. D. Brown, Trends Immunol. **32**, 151 (2011).
6. H. Chen, H. Cai, L. Chen, et al., Clin. Invest. Med. **34** (2), 71 (2011).
7. D. Akramiene, A. Kondrotas, J. Didziapetriene, and E. Kevelaitis, Medicina (Kaunas) **43**, 597 (2007).
8. S. Hanashima, A. Ikeda, and H. Tanaka, Glycoconj. J. **31** (3), 199 (2014).
9. Y. Ikeda, Y. Adachi, T. Ishii, et al., Biol. Pharm. Bull. **31** (1), 13 (2008).
10. S. E. Hardison and G. D. Brown, Nat. Immunol. **13**, 817 (2012).
11. Fuller G.L., Williams J.A., Tomlinson M.G., et al., J. Biol. Chem. **282**, 12397 (2007).
12. KEGG Data Base, http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=hsa04620&show_description=show (Электронный ресурс).
13. B. A. Stone and A. E. Clarke, *Chemistry and biology of (1-3)- β -glucans* (Vic. La Trobe University Press., Bundoora, 1992).
14. J.-S. Lin, J. H. Huang, L.-Y. Hung, et al., J. Leukocyte Biol. **88** (1), 95 (2010).
15. C. Gillaux, C. Méhats, D. Vaiman, et al., J. Immunol. **187** (5), 2766 (2011).
16. Q. Zhang, W. Hui, G. J. Litherland, et al., Ann. Rheum. Dis. **67** (11), 1633 (2008).
17. S. Ganesan, V. A. K. Rathinam, L. Bossaler, et al., J. Immunol. **193** (5), 2519 (2014).
18. W. C. Moss, D. J. Irvine, M. M. Davis, and M. F. Krummel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (23), 15024 (2002).

Molecular Mechanism of Action of Polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L.

E.A. Generalov and A.I. Afremova

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

Experimental data supporting evidence for immunoadjuvant activity of polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. in a model of antibody-producing cells are obtained. Major receptors Dectin-1 and TLR-6, are determined to be required for polysaccharide to demonstrate its biological activity in a model of TNF- α stimulation. It was shown that in the selected model CR3 receptor has not been implicated in recognition of polysaccharide. Using enzyme treatment of polysaccharide from *Helianthus tuberosus* L. the appearance of β -(1→4) and β -(1→3)-glycosidic bonds in the polysaccharide has been proven.

Key words: β -glycan, adjuvant activity, Dectin-1, CR3, TLR-6, polysaccharide