

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТОВ РАЗНЫХ ХЕМОТИПОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ *ESCHERICHIA COLI* И *SALMONELLA* НА СИНТЕЗ $TNF\alpha$ И IL-6 МАКРОФАГО- ПОДОБНЫМИ КЛЕТКАМИ THP-1

Волошина Е.В.¹, Зубова С.В.¹, Прохоренко С.В.³,
Косякова Н.И.², Прохоренко И.Р.^{1,3}

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино

² Отделение аллергологии и иммунологии ПНЦ РАН, г. Пущино

³ Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва

Резюме. Проведено исследование влияния ЛПС, различающихся по структуре липидного или полисахаридного фрагмента, на индукцию цитокинов $TNF\alpha$ и IL-6. Исследование проводилось на линии клеток THP-1, дифференцированных в макрофагоподобные клетки с помощью форбол-миристат-ацетата (PMA). В работе использовали ЛПС *S. typhimurium* (S-хемотип), *S. typhimurium* SL1181 (R-хемотип), *E. coli* O55:B5 (S-хемотип) и *E. coli* JM103 (R-хемотип). Показано, что уменьшение молярной доли липида А/КДО в S-форме ЛПС из *E. coli* сопровождается пониженной экспрессией $TNF\alpha$ и IL-6. Наоборот, для S-формы ЛПС из *Salmonella* снижение молярной доли липида А/КДО значительно усиливало экспрессию $TNF\alpha$. Для R-хемотипов вклад структуры липида А в биологическую активность ЛПС более значим, чем для S, независимо от вида бактерий.

Ключевые слова: липополисахариды, THP-1 клетки, $TNF\alpha$, IL-6

Voloshina E.V., Zubova S.V., Prokhorenko S.V., Kosyakova N.I., Prokhorenko I.R.

A COMPARISON OF DIFFERENT LIPOPOLYSACCHARIDE CHEMOTYPES FROM *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA* UPON SYNTHESIS OF $TNF\alpha$ AND IL-6 BY MACROPHAGE-LIKE THP-1 CELLS

Abstract. Present study was performed to investigate the influence of polysaccharide fragment or lipid A upon induction of $TNF\alpha$ and IL-6 cytokines. The study was performed with human THP-1 monocytic leukemia cells that were induced to differentiate into macrophage-like cells using PMA treatment. Bacterial lipopolysaccharides from *S. typhimurium* (S-chemotype form), *S. typhimurium* SL1181 (R-chemotype, Re-mutant), *E. coli* O55:B5 (S-chemotype), and *E. coli* JM103 (R-chemotype, Re-mutant) were used in this study. A decreased molar ratio for lipid A-KDO in S-form of LPS from *E. coli* is accompanied by diminished $TNF\alpha$ and IL-6 expression. By the contrast, for S-form of LPS from *Salmonella*, a decrease in lipid A-KDO molar ratio did cause a sufficient enhancement of $TNF\alpha$ expression. A contribution of lipid A structure into biological activity of LPS is more significant for Re-chemotype than for S-chemotype, independently on bacterial species. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 6, pp 509-514)

Адрес для переписки:

Волошина Евгения Валерьевна,
ИФПБ РАН
142290, Московская область, г. Пущино,
ул. Институтская, 2.
Тел.: (4967) 73-07-44.
Факс: (4967) 33-05-32.
E-mail: ewgenia2006@rambler.ru

Введение

ЛПС является главным молекулярным маркером, по которому клетки хозяина узнают грамотрицательные бактерии [1]. Взаимодействие ЛПС с клетками врожденной иммунной системы приводит к образованию и высвобождению

эндогенных медиаторов, инициирующих воспаление и иммунные ответы, необходимые для антибактериальной защиты [2]. Моноциты и макрофаги являются главными регуляторными и эффекторными клетками врожденного иммунитета. Они экспрессируют специфические рецепторные системы для узнавания ЛПС, которые представлены мембранно-связанной изоформой CD14 и трансмембранным сигнальным рецептором TLR4 с аксессуарным белком MD-2 [2]. Согласно современным представлениям, активации TLR4 предшествует перенос ЛПС к мембранно-связанному или растворимому рецептору CD14 с помощью ЛПС-связывающего белка LBP [4, 22]. Предполагается, что в общих чертах этот механизм справедлив для ЛПС-сигналикации. Рецепторная система позволяет распознать малейшие различия в структуре ЛПС и сформировать оптимальный ответ организма [24, 25].

Ранее предполагали, что биологическая активность ЛПС связана с липидом А [3], а сахаридный фрагмент ЛПС выполняет вспомогательную роль. Недавно показано, что Re-форма ЛПС и липид А, в отличие от S-формы, способна индуцировать синтез TNF α в отсутствие CD14 [5]. Однако в состав молекулы эндотоксина помимо липида А входят кор, а также полисахарид. Вклад каждой из этих структур в биологическую активность эндотоксинов исследован очень мало (Shiba et al.) [14] показали, что S-форма ЛПС из *Salmonella abortus equi* индуцирует синтез TNF α в мышинных макрофагоподобных клетках J774.1 по механизму, отличному от механизма, индуцированного ЛПС R-формы из этой же бактерии. Позднее были получены прямые доказательства участия О-антигенной полисахаридной части ЛПС в индукции синтеза IL-6 на дифференцированных с помощью 1,25-дигидроксивитамина D3 клетках моноцитарной линии THP-1 [15]. Эти клетки продуцировали высокий уровень IL-6 в ответ на ЛПС из *E. coli* O111:B4 (S-форма), но не отвечали на стимуляцию соединением 506 (синтетический аналог липида А, не содержащий 2-кето-3-дезоксидманно-октулозоновую кислоту (КДО)) или на ЛПС из Re-мутанта *E. coli*. Более того, соединение 406 (синтетический предшественник липида А) и антитела к CD14 ингибировали продукцию IL-6 в ответ на эндотоксин. Полученные авторами результаты указывают на то, что полисахаридная часть ЛПС вносит свой вклад или действует как кофактор в активации дифференцированных THP-1 клеток.

В связи с изложенным целью настоящей работы было изучено влияние как состава липида А, так и роль полисахаридного фрагмента в активации клеток THP-1, дифференцированных в макрофаго-подобные клетки с помощью PMA [13].

Материалы и методы

В экспериментах с культурой клеток были использованы: коммерческие препараты ЛПС из *Salmonella typhimurium* (S-хемотип), *Salmonella typhimurium* SL 1181 (R-хемотип, Re-мутант), ЛПС *Escherichia coli* 055:B5 (S-хемотип); ЛПС из *E. coli* K12 штамм JM103 (R-хемотип, Re-мутант) (Sigma). Для определения IL-6, TNF α использованы коммерческие наборы (Diacclone, USA).

Клетки суспензионной промоноцитарной линии THP-1 (коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург) культивировали в среде RPMI 1640 (Институт полиомиелита им. М.П. Чумакова), содержащей 10% фетальной сыворотки телят (HyClone, USA), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 40 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль/л L-глутамин, 2×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол (Merck) в культуральных флаконах (Costar, USA) при 37 °C в присутствии 5% CO₂ в CO₂-камере «Joan» (Франция).

Жизнеспособность THP-1 клеток определяли окраской трипановым синим по стандартной методике.

Дифференциация и активация THP-1 клеток

Дифференциацию клеток (2×10^5 кл/мл) проводили в 24-х луночных планшетах (Costar, USA), добавляя 10^{-8} М PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, Sigma) по [13]. Клетки культивировали в среде инкубации при 37 °C в присутствии 5% CO₂ в течение 48 часов. Дифференцировалось около 80% клеток. Жизнеспособность дифференцированных клеток составляла не менее 90%. Прикрепившиеся клетки однократно промывали свежей средой и инкубировали 24 часа в среде для культивирования, содержащей 50 нг/мл различных ЛПС. После инкубации супернатант отбирали и хранили при -70 °C до процедуры определения содержания цитокинов.

Определение содержания цитокинов TNF α и IL-6 в пробах

Концентрацию цитокинов TNF α и IL-6 определяли с использованием коммерческих наборов (Diacclone, USA) согласно методике, предложенной производителем. Оптическую плотность образцов определяли при длине волны 450 нм

на планшетном спектрофотометре «STAT FAX 3200» (USA).

Хемотип используемых ЛПС подтвердили методом электрофореза по [6]. Окрашивание геля проводили аммиаком серебра по [21].

Результаты

Морфология и адгезивность недифференцированных и дифференцированных клеток ТНР-1

Исходные клетки ТНР-1 имеют округлую форму с диаметром 12-14 мкм и образуют в суспензии гроздь. В недифференцированной культуре почти нет клеток, прикрепленных к поверхности культурального флакона.

После дифференциации с помощью РМА клетки изменяли размер и форму, превращаясь в макрофагоподобные клетки. В культуре наблюдается высокий процент (около 80%) адгезированных к поверхности пластика клеток.

Агонистическая активность эндотоксинов

Представленная на рисунке 1 электрофореграмма демонстрирует различия в структурах используемых в работе ЛПС. В высокомолекулярной области геля от 15 кДа и выше расположены зоны, указывающие на присутствие полисахаридных фрагментов для S-структур ЛПС. Зоны, ответственные за липид А/КДО и липид А, локализованы в низкомолекулярной области геля и характерны для Re-структур.

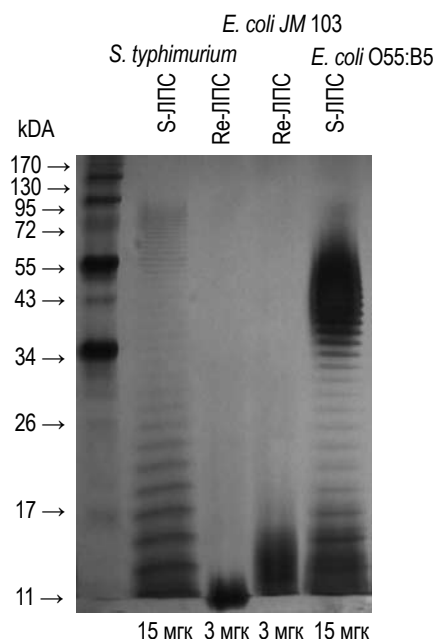


Рисунок 1. Электрофореграмма ЛПС из разных хемотипов *E. coli* и *S. typhimurium*

Агонистическую активность ЛПС в отношении недифференцированных и дифференцированных клеток ТНР-1 определяли по экспрессии цитокинов TNF α и IL-6 в среду после инкубации клеток с ЛПС различной структуры. Чтобы исключить собственный вклад РМА в экспрессию цитокинов [18], клетки перед добавлением ЛПС тщательно отмывали культуральной средой. На недифференцированных клетках ТНР-1 все исследованные типы ЛПС не вызывали индукции TNF α . Индукция IL-6 наблюдалась в следовых количествах.

Экспериментальные данные по индукции TNF α и IL-6 РМА-дифференцированными клетками ТНР-1 представлены на гистограммах (рис. 2, 3). Из полученных результатов видно, что все типы ЛПС индуцировали синтез TNF α и IL-6.

Наибольшей активностью в индукции TNF α из всех исследованных ЛПС обладала S-структура ЛПС *Salmonella*. Активность Re-структуры ЛПС *Salmonella* оказалась ниже по сравнению с S-структурой ЛПС *Salmonella* в 1,5 раза. Активность ЛПС *E. coli* в индукции TNF α , как и в случае с индукцией IL-6, была ниже по сравнению с ЛПС *Salmonella* (рис. 2).

На индукцию IL-6 наиболее заметное влияние также оказывали ЛПС *Salmonella*, причем их активность не зависела от хемотипа (рис. 3). Влияние ЛПС *E. coli* различалось по хемотипам. Re-тип ЛПС *E. coli* имел большую агонистическую активность, чем S-тип ЛПС.

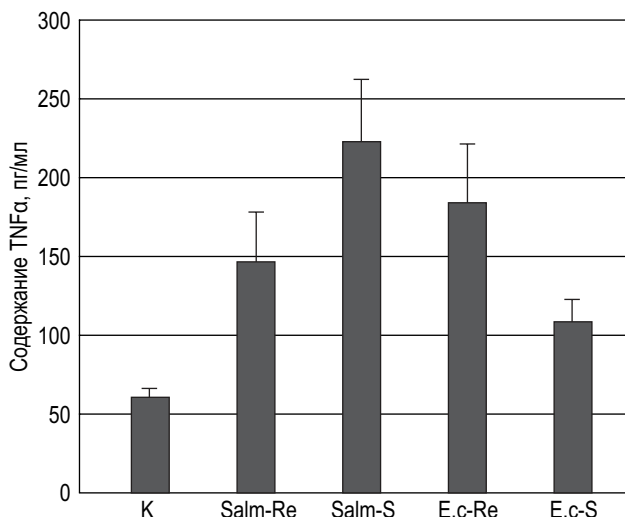


Рисунок 2. Действие ЛПС различной структуры на высвобождение TNF α , дифференцированными с помощью РМА ТНР-1 клетками

Примечание. Приведены средние значения эффектов и средняя квадратичная ошибка по результатам трех независимых экспериментов в двух повторностях.

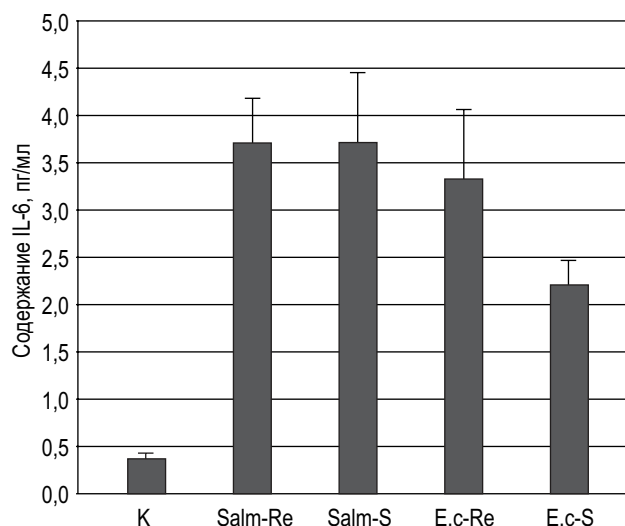


Рисунок 3. Действие ЛПС различной структуры на высвобождение IL-6, дифференцированными с помощью РМА ТНР-1 клетками

Примечание. Приведены средние значения эффектов и средняя квадратичная ошибка по результатам трех независимых экспериментов в двух повторностях.

Обсуждение

В настоящей работе исследовалось влияние структурных элементов ЛПС из *E. coli* и *S. typhimurium* на экспрессию цитокинов макрофагоподобными клетками ТНР-1. Дифференциация ТНР-1 клеток посредством РМА увеличивает их чувствительность к ЛПС, что показано по продукции $\text{TNF}\alpha$ этими клетками [25]. Это связано с многократным увеличением экспрессии TLR4 на поверхности дифференцированных клеток [23]. Ранее было обнаружено, что экспозиция ТНР-1 клеток к РМА сопровождается накоплением транскрипционного фактора NF- κ B в цитоплазме и его транслокацией в ядро [18]. Также известно, что многие гены, кодирующие цитокины, и в том числе $\text{TNF}\alpha$, включают сайты связывания NF- κ B в свои промоторные области [17]. В другой работе на моноцитах человека показано, что адгезия клеток сама по себе не индуцирует продукцию заметного количества $\text{TNF}\alpha$, однако праймирует их к продукции цитокинов в ответ на стимул, в том числе на ЛПС [12]. Таким образом, хотя дифференцированные ТНР-1 клетки являются удобной моделью для исследований из-за наличия на них рецепторов к ЛПС, эти клетки были подвержены двум праймирующим факторам — дифференцирующему агенту РМА и адгезии к поверхности плашек.

ЛПС из *E. coli* [11] и из *Salmonella* [20] активируют клетки через TLR4. Активация эндотоксинами TLR4 сопровождается передачей сигнала по MyD88-зависимому пути и приводит к быстрой активации ядерного фактора NF- κ B

и высвобождению таких провоспалительных цитокинов, как $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 и других [7]. Интенсивность ответа зависит от состава ЛПС. Общепринято, что биологическая активность ЛПС связана с составом и структурой липида А. Липиды А, входящие в состав ЛПС из *E. coli* и из *Salmonella typhimurium*, имеют асимметричное распределение жирных кислот, являются бифосфорилированными, но, что принципиально, различаются по количеству жирных кислот [9, 10]. В состав липида А из *E. coli* входит 6 жирных кислот (максимальная эндотоксическая активность), а в состав липида А из *Salmonella typhimurium* — 7 жирных кислот (минимальная эндотоксическая активность). Ранее было показано, что липид А из разных штаммов *Salmonella*, в отличие от липида А из *E. coli*, практически не активирует дифференцированные ТНР-1 клетки к синтезу $\text{TNF}\alpha$ [19]. Нами показано, что R-ЛПС из обоих видов бактерий, в состав которых помимо липида А входят два остатка КДО, практически одинаково стимулировали клетки к синтезу $\text{TNF}\alpha$ (рис. 2, 3). Таким образом, молекулы КДО выполняют не только структурную функцию, соединяя кор с липидом А, но также являются важными компонентами биологической активности ЛПС. ЛПС из всех хемотипов *E. coli* включают в свой состав липид А/КДО-структуру, оптимальную для проявления эндотоксической активности. На то, что именно эта структура существенна для активности ЛПС из *E. coli*, указывает тот факт, что снижение удельного вклада липида А/КДО в ЛПС снижает экспрессию $\text{TNF}\alpha$ и IL-6 при активации клеток S-ЛПС в сравнение с R-ЛПС (рис. 2, 3).

Наоборот, для S-формы ЛПС из *Salmonella* снижение молярной доли липида А/КДО значительно усиливало экспрессию $\text{TNF}\alpha$. Эти результаты могут быть объяснены ролью полисахаридного фрагмента ЛПС в активации NF- κ B, показанной в работе [8]. Авторы с использованием метода определения активности NF- κ B-зависимой репортерной люциферазы показали, что при активации дифференцированных ТНР-1 клеток липид А и S-ЛПС из *E. coli* одинаково сильно увеличивали люциферазную активность. Липид А из *Salmonella* даже в концентрации 1 мг/мл не влиял на активность люциферазы, тогда как S-форма ЛПС из *Salmonella* была еще более активна, чем из *E. coli*. Полученные в нашей работе результаты хорошо согласуются с данными по влиянию разных хемотипов ЛПС из *Salmonella* на внутриклеточный уровень NF- κ B [8] и позволяют заключить, что полисахаридный фрагмент модулирует биологическую активность липида А из *Salmonella*.

Список литературы

1. Alexander C., Rietschel E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // *J. Endotoxin Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 167-202.
2. Beutler B., Hoebe K., Du X., Ulevitch R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers // *J. Leukoc. Biol.* — 2003. — Vol. 74. — P. 479-485.
3. Galanos C., Luderitz O., Rietschel E.T. In *Lipopolysaccharide: properties of an amphipathic molecule* // Ed., Elsevier, Amsterdam. — 1984. — Vol. 1. — P. 46.
4. Hamann L., Alexander C., Stamme C., Zahringer U., Schumann R.R. Acute-phase concentrations of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibit innate immune cell activation by different LPS chemotypes via different mechanisms // *Infection and Immunity.* — 2005. — Vol. 73, N 1. — P. 193-200.
5. Jiang Z., Georgel P., Du X., Shamel L., Sovath S., Mudd S., Huber M., Kalis C., Keck S., Galanos C., Freudenberg M., Beutler B. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling // *Nat. Immunol.* — 2005. — Vol. 6, N 6. — P. 565-570.
6. Krauss J.H., Seydel U., Weckesser J., Mayer H. Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. // *Eur. J. Biochem.* — 1989. — Vol. 180. — P. 519-526.
7. Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2. // *Seminars in Immunology.* — 2004. — Vol. 16, N 1. — P. 11-16.
8. Muroi M., Tanamoto K. The polysaccharide portion plays an indispensable role in *Salmonella* lipopolysaccharide-induced activation of NF- κ B through human Toll-like receptor 4 // *Infect. Immun.* — 2002. — Vol. 70, N 11. — P. 6043-6047.
9. Oshiumi H., Matsumoto M., Funami K., Akazawa T., Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction // *Nat. Immunol.* — 2003. — Vol. 4. — P. 161-167.
10. Oshiumi H., Sasai M., Shida K., Fujita T., Matsumoto M., Seya T. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta // *J. Biol. Chem.* — 2003. — Vol. 278. — P. 49751-49762.
11. Poltorak A., Ricciardi-Castagnoli P., Citterio S., Beutler B. Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 2163-2167.
12. Rosengart M. R., Arbabi S., Bauer G.J., Garcia I., Jelacic S., Maier R.V. The actin cytoskeleton: an essential component for enhanced TNF alpha production by adherent monocytes // *Shock.* — 2002. — Vol. 17, N 2. — P. 109-113.
13. Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3 // *J. Leukoc. Biol.* — 1996. — Vol. 59, N 4. — P. 555-561.
14. Shiba T., Kusumoto S., Inage M., Chaki H., Shimamoto T. Recent developments in the organic synthesis of lipid A in relation to biologic activities // *Res. Infect. Dis.* — 1984. — Vol. 6. — P. 478-482.
15. Suda Y., Aoyama K., Arimoto K., Tamura T., Shoichi Kusumoto S. S-form lipopolysaccharide (LPS), but not lipid A or R-chemo-type LPS, induces interleukin-6 production in vitamin D3-differentiated THP-1 cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 1999. — Vol. 257, N 2. — P. 327-332.
16. Suda Y., Aoyama K., Arimoto K., Tamura T., Shoichi Kusumoto S. S-form lipopolysaccharide (LPS), but not lipid A or R-chemo-type LPS, induces interleukin-6 production in vitamin D3-differentiated THP-1 cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 1999. — Vol. 257, N 2. — P. 327-332.
17. Takashiba S., Shapira L., Amar S., Van Dyke T.E. Cloning and characterization of human TNF alpha promoter region // *Gene.* — 1993. — Vol. 131. — P. 307-308.
18. Takashiba S., Van Dyke T.E., Amar S., Murayama Y., Soskolne A.W., Shapira L. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor B // *Infect. Immun.* — 1999. — Vol. 67, N 11. — P. 5573-5578.
19. Tanamoto K.-i., Azumi S. *Salmonella*-type heptaacylated lipid A is inactive and acts as an antagonist of lipopolysaccharide action on human line cells. // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 3149-3156.
20. Tapping R.I., Akashi S., Miyake K., Godowski P.J., Tobias P.S. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2, is a signaling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 165. — P. 5780-5787.
21. Tsai C.M. and Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.* — 1982. — Vol. 119. — P. 115-119.
22. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. CD14, a receptor for

complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein // Science. — 1990. — Vol. 249. — P. 1431-1432.

23. Zarembek K.A., Godowski P.J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leucocytes in response to microbes, their products, and cytokines // J. Immunol. — 2002. — Vol. 168. — P. 554-561.

24. Zughaier S.M., Tzeng Y.L., Zimmer S.M., Datta A., Carlson R.W., Stephens D.S. Neisseria meningitidis lipooligosaccharide structure-dependent activation of the macrophage CD14/Toll-like

receptor 4 pathway // Infection and Immunity. — 2004. — Vol. 72, N 1. — P. 371-380.

25. Zughaier S.M., Zimmer S.M., Datta A., Carlson R.W., Stephens D.S. Differential induction of the Toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins // Infect. Immun. — 2005. — Vol. 73, N 5. — P. 2940-2950.

поступила в редакцию 16.06.2009

отправлена на доработку 19.06.2009

принята к печати 25.06.2009