© Дагиль Ю.А., Пащенко М.В., 2020

Дагиль Ю.А., Пащенко М.В.

Сопоставление трех видов клеточных тест-систем для оценки биологической активности агонистов рецептора NOD2

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115522, г. Москва, Российская Федерация

Резюме

Введение. Агонисты рецептора NOD2 представляют собой перспективный класс активаторов врожденного иммунитета. Актуально создание тест-систем для качественного и количественного определения их биологической активности.

Цель работы – сопоставить основные характеристики трех видов репортерных клеток, предназначенных для оценки биологической активности агонистов NOD2: с эндогенной экспрессией NOD2, с временной гиперэкспрессией NOD2 и со стабильной гиперэкспрессией NOD2.

Материал и методы. Репортерные клетки с эндогенной экспрессией NOD2 (293Luc) были получены путем стабильной трансфекции клеток HEK-293T геном люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Клетки с временной гиперэкспрессией NOD2 (293Luc-tNOD2) получали путем временной трансфекции клеток 293Luc плазмидой, кодирующей ген *NOD2* под конститутивным промотором. При длительном культивировании NOD2-трансфицированных клеток с селективным антибиотиком были получены клетки, стабильно гиперэкспрессирующие NOD2 (293Luc-stNOD2). Для каждого вида клеток были получены контрольные клетки, позволяющие подтверждать активацию NF-κB через рецептор NOD2. Эти клетки стимулировали 24 ч агонистом NOD2 – мурамилдипептидом (МДП); на выходе измеряли люциферин-зависимую хемилюминесценцию клеточных лизатов.

Результаты. Фоновый сигнал у клеток 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2 был повышен соответственно в 30 и в 170 раз по сравнению с клетками 293Luc, что указывает на активацию NF-κB в отсутствие агониста. В то же время предел количественного определения МДП в среде у клеток 293Luc-stNOD2 был на порядок меньше, чем у 293Luc (1,6 и 20 нМ соответственно). У систем с использованием клеток 293Luc и 293Luc-stNOD2 отмечались приемлемые значения правильности и повторяемости, тогда как клетки 293Luc-tNOD2 характеризовались неудовлетворительной повторяемостью, а также требовали повышенного расхода реактивов и рабочего времени.

Заключение. Клеточные линии 293Luc и 293Luc-stNOD2 могут использоваться для определения биологической активности агонистов рецептора NOD2.

Ключевые слова: NOD2; мурамилдипептид; NF-κB; люцифераза; врожденный иммунитет

Статья поступила 15.05.2020. Принята в печать 16.06.2020.

Для цитирования: Дагиль Ю.А., Пащенко М.В. Сопоставление трех видов клеточных тест-систем для оценки биологической активности агонистов рецептора NOD2. Иммунология. 2020; 41 (4): 304–311. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-304-311>

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания «Изучение подходов к созданию иммуноотропных препаратов» (шифр: Подход-16), соглашения № 388-00049-16 от 25.01.2016, 388-03-108 от 30.01.2017, 388-03-2018-179 от 1.02.2018, 388-03-2019-110 от 8.02.2019, 388-02-2020-008 от 15.01.2020.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Пащенко Михаил Владимирович –
доктор медицинских наук,
и.о. заведующего
лабораторией клинической
иммунологии,
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России,
Москва, Российская Федерация
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Dagil Yu.A., Pashenkov M.V.

A comparison of three types of cell-based test systems for the assessment of biological activity of NOD2 receptor agonists

National Research Center Institute of Immunology of the Federal Medical-Biological Agency of Russia, 115522, Moscow, Russian Federation

Abstract

Introduction. NOD2 receptor agonists are a promising class of activators of innate immunity. Test systems for qualitative and quantitative measurements of their biological activity are required.

Aim – to compare main characteristics of three reporter cell types devised to assess biological activity of NOD2 agonists: cells with endogenous NOD2 expression, with transient NOD2 overexpression, with stable NOD2 overexpression.

Material and methods. Reporter cells with endogenous NOD2 expression (293Luc) were obtained by stably transfecting HEK-293T cells with luciferase reporter gene under an NF- κ B-dependent promoter. Cells with transient NOD2 overexpression (293Luc-tNOD2) were obtained by transiently transfecting 293Luc cells with a plasmid encoding *NOD2* gene under a constitutive promoter. Cells with stable NOD2 overexpression (293Luc-stNOD2) were obtained by prolonged culture of NOD2-transfected cells with selective antibiotic. For each cell type, control cells were created enabling to confirm NOD2-dependent NF- κ B activation. Cells were stimulated for 24 h with a NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP); as the readout, luciferin-dependent chemiluminescence of cell lysates was measured.

Results. Background signal in 293Luc-tNOD2 and 293Luc-stNOD2 was, respectively, 30 and 170 times higher than in 293Luc cells, pointing at NF- κ B activation in the absence of NOD2 agonists. At the same time, limit of quantitation of MDP by 293Luc-stNOD2 cells was an order of magnitude lower than by 293Luc cells (1.6 nM and 20 nM, respectively). Systems based on 293Luc and 293Luc-stNOD2 cells possessed acceptable accuracy and repeatability, 293Luc-tNOD2 cells showed unsatisfactory repeatability as well as increased time and reagent consumption.

Conclusion. 293Luc and 293Luc-stNOD2 cell lines can be used to measure biological activity of NOD2 receptor agonists.

Keywords: NOD2; muramyl dipeptide; NF- κ B; luciferase; innate immunity

Received 15.05.2020. **Accepted** 16.06.2020.

For citation: Dagil Yu.A., Pashenkov M.V. A comparison of three types of cell-based test systems for the assessment of biological activity of NOD2 receptor agonists. *Immunologiya*. 2020; 41 (4): 304–11. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-304-311> (in Russian)

Funding. The work was performed in the framework of the State task «Study of approaches to the creation of immunotropic drugs» (cipher: Approach-16), contracts No 388-00049-16 from 25.01.2016, 388-03-108 from 30.01.2017, 388-03-2018-179 from 1.02.2018, 388-03-2019-110 from 8.02.2019, No 388-02-2020-008 from 15.01.2020.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Введение

Активаторы врожденного иммунитета представляют большой интерес как средства профилактики и лечения инфекционных заболеваний человека. Одной из наиболее разработанной в фармакологическом отношении групп этих препаратов являются агонисты рецептора NOD2 врожденной иммунной системы. Базовым агонистом этого рецептора является фрагмент бактериального пептидогликана – мурамилдипептид (МДП, или N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин) [1]. В России из этой группы препаратов наиболее хорошо известен глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП, или N-ацетил-D-глюкозаминил-N-ацетил-D-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин) [2]. В мире группа NOD2-агонистов представлена также препаратами мурабутид, ромуртид и мифамуртид [3–5]. Ведутся разработки других, более эффективных, агонистов, а также антагонистов рецептора NOD2 [6–8], что требует создания надежных, информативных и удобных в применении тест-систем для оценки биологической активности и фармакокинетики вновь создаваемых соединений.

Большинство рецепторов врожденного иммунитета, в том числе NOD2 и его ближайший родственник NOD1, передают сигнал в ядро при помощи факторов транскрипции семейства NF- κ B [9, 10]. Поэтому для оценки биологической активности различных активаторов врожденного иммунитета используются репортерные клеточные линии, в которых измеряемым параметром является NF- κ B-зависимая экспрессия репортерного белка, например люциферазы, щелочной фосфатазы или зеленого флуоресцентного белка. Для введения в клетки репортерных генов, регулируемых NF- κ B-зависимым промотором, используют плазмидные или вирусные векторы. Транфекция репортерными конструкциями может быть временной (делается в каждом эксперименте, что повышает трудозатраты и снижает воспроизводимость) или стабильной. Последний вариант реализован в виде репортерных клеточных линий, созданных, в частности, фирмой Invivogen (США).

Для придания системе специфичности в отношении конкретного рецептора, как правило, прибегают к временной или стабильной гиперэкспрессии данного

For correspondence

Mikhail V. Pashenkov –
MD, Acting Head of the
Laboratory of Clinical Immunology,
NRC Institute of Immunology
FMBA of Russia,
Moscow, Russian Federation
E-mail: mvpashenkov@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

рецептора, для чего используют векторные конструкции, в которых экспрессия интересующего рецептора регулируется конститутивно активным промотором. Однако гиперэкспрессия рецептора может приводить к нежелательным последствиям, в частности к активации NF-κB в отсутствие специфических агонистов [9, 10]. Кроме того, репортерные клетки экспрессируют эндогенные рецепторы врожденного иммунитета, что в ряде случаев может затруднять интерпретацию результатов. Альтернативным подходом является использование эндогенной экспрессии интересующего рецептора репортерными клетками, без его искусственной гиперэкспрессии; специфичность таких систем контролируют созданием вариантов репортерных клеток с нокаутом или нокаутом данного рецептора.

В данной работе мы сравнили ключевые характеристики трех видов репортерных клеток, предназначенных для оценки биологической активности агонистов NOD2: 1) с использованием эндогенной экспрессии NOD2; 2) с использованием временной гиперэкспрессии NOD2; 3) с использованием стабильной гиперэкспрессии NOD2. Все три вида клеток получены на основе клеточной линии HEK-293T, стабильно трансфицированной репортерным геном люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Вариант 2 характеризуется наибольшими разбросами измеряемого показателя (хемилюминесценции) в пределах опыта, а также требует наибольших затрат времени и реактивов. Варианты 1 и 3 характеризуются хорошей воспроизводимостью и взаимно дополняют друг друга с точки зрения эффективного диапазона концентраций агониста, что позволяет применять их как для качественных, так и для количественных исследований агонистов NOD2-рецептора.

Материал и методы

Плазмиды и реактивы. Использовали следующие плазмиды: 1) pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro], кодирующую репортерный ген люциферазы (luc2P) под контролем NF-κB-зависимого промотора (Promega, США); 2) pUNO-hNOD2a, кодирующую ген *NOD2* человека под контролем конститутивного промотора (Invivogen, США); 3) контрольную плазмиду pcDNA3.1 (Life Technologies, Великобритания); 4) pcDNA3.3-Cas9n, кодирующую Cas9-никазу (Cas9n) [11]; 5) плазмиды pKS-gRNA-NOD2.1 и pKS-gRNA-NOD2.2, таргетирующие два близлежащих сайта в гене *NOD2* человека [12]; 6) плазмиды pKS-gRNA-NOD1.1 и pKS-gRNA-NOD1.2, таргетирующие два близлежащих сайта в гене *NOD1* человека [12]. N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) и бластицидин S были приобретены у фирмы Invivogen, липофектамин 2000, гигромицин В и рекомбинантный фактор некроза опухолей (ФНО) человека – у Life Technologies. N-ацетил-D-глюкозаминил-N-ацетил-D-сорбитоламинил-D-лактоил-L-аланил-D-изоглутамил-мезодиаминопимелиновая кислота (ГС-триДАП) была получена, как описано ранее [12] и любезно предоставлена к.х.н. В.Л. Львовым (Институт иммунологии).

Получение репортерных клеток, содержащих ген люциферазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Клетки HEK293T культивировали в среде DMEM («Панэко», Российская Федерация) с добавлением 2 mM L-глутамин (Sigma, США) и 10 % инактивированной фетальной телячьей сыворотки (РАА, Австрия). Клетки трансфицировали плазмидой pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] в комплексе с липофектамином 2000 согласно инструкции производителя. Селекцию стабильных трансфектантов выполняли в присутствии 200 мкг/мл гигромицина В (Life Technologies). Полученную клеточную линию, названную 293Luc, далее вели с указанной концентрацией гигромицина В, пассивируя 2–3 раза в нед.

Получение клеток 293Luc со стабильной гиперэкспрессией NOD2. Экспоненциально растущие клетки 293Luc высевали в 24-луночный планшет по 10^5 на лунку. По достижении конфлюэнтности 50 % (примерно $2 \cdot 10^5$ клеток на лунку) клетки трансфицировали плазмидой pUNO-hNOD2a в дозе от $4 \cdot 10^4$ до 4 копий плазмиды на клетку в комплексе с липофектамином 2000. Через 2 дня начинали селекцию стабильных трансфектантов в присутствии гигромицина В и бластицидина S (10 мкг/мл). Минимальное количество плазмиды, при котором клетки приобретали резистентность к бластицидину S, составило 400 копий на клетку. Клеточная линия, трансфицированная указанной дозой плазмиды и стабильно растущая в присутствии гигромицина В и бластицидина S на 21-й день после трансфекции, была названа 293Luc-stNOD2 (stable NOD2). Полученная клеточная линия является аналогом клеточной линии HEK-Blue™ hNOD2 (Invivogen).

Получение вариантов клеток 293Luc с нокаутом генов NOD2 и NOD1. Для нокаутирования генов использовали технологию CRISPR-Cas9 [12, 13]. Вкратце, клетки 293Luc котрансфицировали плазмидами pcDNA3.3-Cas9n и двумя плазмидами, таргетирующими ген *NOD2* или *NOD1*. Через 3 суток трансфицированные клетки пересевали для получения клеточных клонов. Через 3 нед собирали клоны, среди которых отбирали те, у которых отсутствовал ответ на специфический агонист нокаутируемого рецептора при сохранности ответа на ФНО. Наличие изменений геномных последовательностей генов *NOD2* и *NOD1* в отобранных клонах подтверждали путем секвенирования по Сэнгеру. В работе использовали по одному клону с нокаутом *NOD2* и *NOD1* (293Luc-ΔNOD2 и 293Luc-ΔNOD1).

Стимуляция клеток 293Luc и их вариантов с нокаутом гена NOD2 и со стабильной гиперэкспрессией NOD2. Клетки высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты (SPL Life Sciences, Республика Корея) по 10^4 клеток на 100 мкл на лунку. Через 48 ч, когда монослой достигал коэффлюэнтности 70–80 %, добавляли МДП в необходимой конечной концентрации либо рекомбинантный ФНО человека в конечной концентрации 100 нг/мл (положительный контроль). В лунки отрицательного контроля добавляли DMEM в том же объеме. Все стимуляции делали в дублях или триплетах. Еще через

24 ч в лунки добавляли лизирующий субстрат Bright-Glo (Promega), полученные клеточные лизаты переносили в 96-луночные планшеты из белого пластика (SPL Life Sciences) и измеряли люциферазную активность (хемилюминесценцию) на приборе Lucy II (Anthos, Австрия). Результаты выражали в относительных световых единицах (ОСЕ). Для корректного сравнения экспериментов результаты нормализовали, принимая ответ данного вида клеток на ФНО в каждом эксперименте за 100 %.

Временная гиперэкспрессия NOD2 в клетках 293Luc в сочетании со стимуляцией МДП. Клетки с временной гиперэкспрессией NOD2 ниже называются 293Luc-tNOD2 (transient NOD2). Методика описана в других работах [14]. 96-луночные планшеты с клетками 293Luc готовили, как описано выше. В день эксперимента готовили комплексы, содержащие: 1) требуемое количество МДП (контроль – среда без МДП); 2) плазмиду pUNO-hNOD2a в количестве 2 нг/лунку или примерно $1,0-1,5 \cdot 10^4$ копий на клетку (контроль – плазида pcDNA3.1, 2 нг/лунку); 3) липофектамин 2000 (0,4 мкл/лунку). Комплексы добавляли к клеткам в течение 10–15 мин после приготовления. В качестве положительного контроля использовали ФНО. Через 24 ч измеряли люциферазную активность, как описано выше.

Анализ данных. Отношение сигнала к шуму рассчитывали как отношение ОСЕ в лунках с агонистами (МДП или ФНО) к ОСЕ в лунках без агонистов (фон). Предел количественного определения (ПКО) устанавливали путем анализа образцов, не содержащих МДП и содержащих низкие концентрации МДП, все в 6 повторностях. ПКО определяли как наименьшую концентрацию МДП, при которой получаемый сигнал еще удовлетворял следующим 3 критериям [15]: 1) сигнал в любой из 6 лунок с данной концентрацией МДП должен быть выше, чем $M + 1,645\sigma$ фонового сигнала; 2) наличие высокодостоверного отличия сигнала при данной концентрации МДП от фонового сигнала ($p < 0,001$ при использовании t -критерия Стьюдента); 3) коэффициент вариации сигнала при данной концентрации МДП – не более 20 %. Правильность и повторяемость оценивали путем 6-кратного определения

концентрации МДП в растворе, содержащем известное количество МДП. Правильность рассчитывали как $M \pm \sigma$ относительного отклонения измеренной концентрации МДП от фактической, выраженного в процентах. Повторяемость (сходимость) оценивали по коэффициенту вариации измеренной концентрации МДП (в процентах). Для статистического анализа использовали t -критерий Стьюдента.

Результаты

Базальные и индуцированные показатели хемилюминесценции у трех видов репортерных клеток. Отношение полезного сигнала к шуму

На рисунке и в табл. 1 показаны базальные и индуцированные показатели хемилюминесценции клеток 293Luc, 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2.

Фоновый сигнал у клеток 293Luc-tNOD2 был примерно в 30 раз выше, а у клеток 293Luc-stNOD2 – в 170 раз выше, чем у клеток 293Luc (см. табл. 1). Таким образом, гиперэкспрессия NOD2 приводит к резкому повышению фоновой (в отсутствие специфического агониста) активации NF-κB.

ФНО индуцировал примерно одинаковую люциферазную активность во всех трех типах клеток (см. табл. 1). Однако, поскольку фоновые сигналы резко различались, отношение сигнала к шуму при стимуляции ФНО у клеток 293Luc составило 2450 ± 820 , тогда как у клеток 293Luc-tNOD2 – 137 ± 91 , а у клеток 293Luc-stNOD2 – всего $12,2 \pm 3,7$.

Зависимость ответа от логарифма концентрации МДП у клеток 293Luc, экспрессирующих эндогенный NOD2, носила характер сигмоидной функции (рисунок А). Верхнее плато ответа на МДП у клеток 293Luc не превышало 5 % от ответа на ФНО, EC_{50} составила $0,18 \pm 0,05$ мкМ ($\lg EC_{50} = -0,77 \pm 0,14$). Однако в связи с низкой базальной хемилюминесценцией клетки 293Luc характеризовались наибольшими среди трех видов клеток отношениями полезного сигнала к шуму при ответе на МДП (см. табл. 1).

У клеток 293Luc-stNOD2 кривая ответа на МДП имела колоколообразную форму (см. рисунок Б). Максимум ответа на МДП, составляющий > 50 % ответа

Таблица 1. Функциональные свойства клеток 293Luc, 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2*

Агонист	Показатель (ед. измерения)	293Luc	293Luc-tNOD2	293Luc-stNOD2
–	Сигнал (ОСЕ)	$6,6 \pm 2,9$	201 ± 182	1109 ± 504
ФНО (100 нг/мл)	Сигнал (ОСЕ)	15036 ± 3482	15299 ± 1599	12359 ± 2864
	ОСШ	2450 ± 820	137 ± 91	$12,2 \pm 3,7$
МДП (100 нМ)	Сигнал (ОСЕ)	140 ± 69	1800 ± 978	9975 ± 3173
	ОСШ	$22,7 \pm 9,8$	$11,3 \pm 6,6$	$10,4 \pm 5,1$
МДП (1 мкМ)	Сигнал (ОСЕ)	409 ± 212	2011 ± 616	1143 ± 170
	ОСШ	$64,6 \pm 31,8$	$16,8 \pm 11,3$	$1,46 \pm 0,52$
МДП	$\lg EC_{50}$	$-0,77 \pm 0,14$	$-1,64 \pm 0,25$	$-1,68 \pm 0,15$
МДП	Предел количественного определения (мкМ)	0,02	$\leq 0,02$	0,0016

Примечание. * – значения средних и стандартных отклонений рассчитаны по результатам 7–15 независимых экспериментов; ОСШ – отношение сигнала к шуму; ФНО – фактор некроза опухоли; здесь и в табл. 2: МДП – мурамилдипептид.

Примеры ответов клеток 293Luc, 293Luc-tNOD2 и 293Luc-stNOD2, а также соответствующих контрольных клеток на агонисты NOD-рецепторов.

А – ответ клеток 293Luc и контрольных клеток 293Luc-ΔNOD2 на мурамилдипептид (МДП); Б – ответ клеток 293Luc-stNOD2 и контрольных клеток 293Luc на МДП; В – ответ на МДП клеток 293Luc-tNOD2 и контрольных клеток 293Luc, трансфицированных плазмидой pcDNA3.1; Г – ответ клеток 293Luc, 293Luc-ΔNOD2 и 293Luc-ΔNOD1 на ГС-триДАП; Д – ответ клеток 293Luc-stNOD2 и контрольных клеток 293Luc на ГС-триДАП. На всех графиках показаны результаты 1 репрезентативного эксперимента из не менее чем 3 для каждой серии ($M \pm \sigma$ по 3 повторностям в каждом эксперименте). На графиках А, Б, В и Д пунктирной линией отмечена средняя фоновая хемилюминесценция опытных клеток, точечно-пунктирной линией – средняя ФНО-индуцированная хемилюминесценция опытных клеток.

на ФНО, достигался при концентрации около 0,1 мкМ. При дальнейшем повышении концентрации МДП ответ падал, так что при концентрациях свыше 1 мкМ уровни хемилюминесценции были даже ниже базального, что может быть обусловлено истощением пулов сигнальных молекул при гиперактивации NOD2. Левая часть кривой «доза–ответ» аппроксимировалась сигмоидной функцией (рисунок Б), причем EC_{50} была примерно на порядок ниже, чем у клеток 293Luc ($EC_{50} = 0,021 \pm 0,008$ мкМ, $\log_{10}EC_{50} = -1,68 \pm 0,15$; см. табл. 1). Отношения сигнала к шуму у клеток

293Luc-stNOD2 были существенно ниже, чем у клеток 293Luc, за счет как более высокой базальной хемилюминесценции, так и аутоингибирования сигнала при высокой концентрации МДП.

Клетки 293Luc-tNOD2 занимали промежуточное положение по указанным показателям (см. табл. 1). При наиболее высокой исследованной концентрации МДП (2,5 мкМ) тоже отмечалась тенденция к аутоингибированию сигнала, хотя и не столь выраженная, как у клеток 293Luc-stNOD2 (рисунок В). Также у клеток 293Luc-tNOD2 обращают на себя внимание

большие стандартные отклонения сигнала в пределах опыта, что указывает на низкую воспроизводимость методики.

Предел количественного определения

Предел количественного определения МДП составил у клеток 293Luc – 20 нМ, у клеток 293Luc-stNOD2 – 1,6 нМ (см. табл. 1). Для клеток 293Luc-tNOD2 этот показатель не был точно определен, он находился в диапазоне 4–20 нМ.

Специфичность

Как любые другие клетки, клеточная линия НЕК293Т и ее модифицированные варианты экспрессируют не только NOD2, но и другие паттерн-распознающие рецепторы, стимуляция которых может приводить к активации NF-κB. В связи с этим необходима проверка специфичности сигнала, получаемого под действием исследуемых соединений.

При использовании линии 293Luc контролями специфичности служат варианты этой клеточной линии с нокаутами генов *NOD2* и других паттерн-распознающих рецепторов. Например, клетки с нокаутом *NOD2* (293Luc-ΔNOD2) не отвечают на МДП в концентрациях вплоть до 50 мкМ (см. рисунок А). Тем самым подтверждается, что МДП активирует NF-κB в клетках 293Luc исключительно через рецептор NOD2. Для сравнения, другое вещество мурамилпептидной природы, ГС-триДАП, тоже вызывает активацию NF-κB в клетках 293Luc, но эта активность сохраняется в клетках 293Luc-ΔNOD2 и исчезает в клетках 293Luc-ΔNOD1 с нокаутом гена *NOD1*, что указывает на избирательность ГС-триДАП по отношению к рецептору NOD1 (см. рисунок Г).

Контролем для клеток 293Luc-stNOD2 служат клетки 293Luc. Как было отмечено выше, клетки 293Luc-stNOD2 отвечают на МДП в концентрациях на порядок ниже, чем клетки 293Luc, что подтверждает активность МДП по отношению к рецептору NOD2 (см. рисунок Б). Вещество ГС-триДАП, являющееся агонистом NOD1, тоже активирует NF-κB и в клетках 293Luc, и в клетках 293Luc-stNOD2 (см. рисунок Д). Однако EC_{50} для ГС-триДАП в клетках 293Luc-stNOD2 даже несколько выше, чем в клетках 293Luc (в опыте на рисунке Д – 2,54 мкМ и 1,43 мкМ соответственно). Следовательно, активация NF-κB в клетках 293Luc-stNOD2 под действием ГС-триДАП не обусловлена активацией NOD2.

Правильность и повторяемость

Для оценки правильности и повторяемости методик исследовали одно и то же разведение МДП в 6 повторностях (расчетная конечная концентрация МДП в среде составляла 100 нМ в случае клеток 293Luc и 293Luc-tNOD2 и 10 нМ в случае 293Luc-stNOD2), после чего по калибровочным кривым рассчитывали концентрацию МДП в среде. Как видно из табл. 2, клетки 293Luc и 293Luc-stNOD2 позволяли правильно определять концентрацию МДП в среде при достаточно хорошей повторяемости. В то же время клетки 293Luc-tNOD2

характеризовались неудовлетворительной повторяемостью, о чем свидетельствует высокий коэффициент вариации.

Обсуждение

NOD2-репортерные клеточные линии могут использоваться для решения нескольких задач: 1) фундаментальные исследования рецептора NOD2, в частности изучение его сигнальных путей; 2) изучение биологической активности вновь создаваемых агонистов и антагонистов NOD2, а также контроль качества производственных партий этих групп препаратов; 3) определение содержания агонистов NOD2 в биологических жидкостях. Различия свойств полученных клеточных линий определяют их сферы применения. Ниже мы исключаем из сравнения клетки 293Luc-tNOD2 с временной гиперэкспрессией NOD2, поскольку данная модель является наиболее затратной с точки зрения рабочего времени и расходных материалов и обладает наихудшей воспроизводимостью.

Изучение сигнальных путей рецептора NOD2.

Клетки 293Luc характеризуются естественной экспрессией рецептора NOD2, низкой фоновой активацией NF-κB, а также высоким отношением сигнала к шуму при стимуляции классическим агонистом NOD2 (МДП), что позволяет использовать их для изучения сигнальных путей рецептора NOD2, например путем нокаутирования или ингибирования известных или предполагаемых компонентов сигнальных путей. Клетки 293Luc-stNOD2 менее пригодны для этой цели, поскольку избыточная экспрессия белка NOD2 может приводить к его неестественным взаимодействиям с другими белками, искажая естественную картину NOD2-зависимой передачи сигнала. Проявлением этого может служить высокая фоновая активация NF-κB в клетках 293Luc-stNOD2 в отсутствие специфического агониста, что уже было описано в литературе [9, 10].

Изучение биологической активности агонистов и антагонистов NOD2.

Для определения биологической активности агонистов NOD2 пригодны обе клеточные линии. Хотя антагонисты NOD2 в работе не изучались за неимением коммерчески доступных соединений этого класса, есть основания для предположения, что и этот класс соединений может быть изучен с помощью полученных клеточных линий. Однако необходимо учитывать, что избыточная чувствительность клеток 293Luc-stNOD2 к агонистам NOD2 способна приводить к искажению показателей активности изучаемых соединений, в связи с чем требуется перепроверка данных, полученных с помощью 293Luc-stNOD2, на клетках 293Luc с естественной экспрессией NOD2, которая сопоставима с экспрессией NOD2 в макрофагах человека [12].

Определение агонистов NOD2 в биологических жидкостях. Как клетки 293Luc, так и клетки 293Luc-stNOD2 могут в перспективе быть использованы для количественного определения агонистов NOD2 в биологических жидкостях, например при фармакокине-

тических исследованиях. Оба вида клеток характеризуются приемлемыми показателями правильности и повторяемости. Предел определения МДП у клеток 293Luc и 293Luc-stNOD2 сопоставим или лучше, чем у систем, основанных на высокоэффективной жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии [16–18]. Хотя полезный диапазон каждой клеточной линии сравнительно невелик (20 нМ – 1 мкМ для клеток 293Luc, 1,6 нМ – 100 нМ для клеток 293Luc-stNOD2), параллельное тестирование образцов на двух клеточных линиях позволяет расширить его примерно до трех порядков. При использовании клеток 293Luc-stNOD2 возможно ошибочное занижение концентрации агониста, обусловленное колоколообразной зависимостью ответа от концентрации у клеток 293Luc-stNOD2, тогда как параллельное тестирование образцов на клетках 293Luc-stNOD2 и 293Luc позволит избежать этой ошибки, поскольку у клеток 293Luc отсутствует аутоингибирование сигнала вплоть до концентрации МДП 50 мкМ (данные не представлены).

Выводы

1. В работе получены репортерные клеточные линии с естественной экспрессией, с временной гиперэк-

спрессией и со стабильной гиперэкспрессией рецептора NOD2, а также соответствующие контрольные линии.

2. Полученные клеточные линии позволяют оценивать биологическую активность агонистов рецептора NOD2, а также могут быть использованы для других исследований, связанных с активацией этого рецептора. Наилучшими характеристиками по правильности и повторяемости обладают клеточные линии с естественной экспрессией NOD2 (293Luc) и со стабильной гиперэкспрессией NOD2 (293Luc-stNOD2).

3. Нижний предел количественного определения мурамилдипептида у клеточной линии с 293Luc составляет 20 нМ, у клеточной линии 293Luc-stNOD2 – 1,6 нМ. Диапазон измеряемых концентраций МДП при параллельном использовании двух клеточных линий варьирует от 1,6 до 1 мкМ.

Вклад авторов

Участие в получении репортерных клеточных линий, оценка их функциональных свойств, статистическая обработка данных, участие в написании статьи – Дагиль Ю.А.; общее руководство работой, получение репортерных клеточных линий, участие в статистической обработке результатов, написание статьи – Пашенков М.В.

Литература

- Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G. et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.
- Винницкий Л.И., Бунятян К.А., Пинегин Б.В., Миронова Е.В., Швец Л.И., Волков А.А. и др. Отечественный иммуномодулятор нового поколения Ликопид в комплексном лечении и профилактике инфекционных осложнений в хирургической клинике. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 1997; (11): 46–9.
- Bahr G.M., Darcissac E., Bevec D., Dukor P., Chedid L. Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 17 (2): 117–31.
- Azuma I. Review: inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14 (3): 487–96.
- Kager L., Potschger U., Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2010; 6: 279–86.
- Kecek Plesec K., Urbancic D., Gobec M., Pekosak A., Tomasic T., Anderluh M. et al. Identification of indole scaffold-based dual inhibitors of NOD1 and NOD2. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24 (21): 5221–234.
- Wang S., Yang J., Li X., Liu Z., Wu Y., Si G. et al. Discovery of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione (BZD) derivatives as dual nucleotide binding oligomerization domain containing 1/2 (NOD1/NOD2) antagonists sensitizing paclitaxel (PTX) to suppress Lewis lung carcinoma (LLC) growth in vivo. *J. Med. Chem.* 2017; 60 (12): 5162–92.
- Rickard D.J., Sehon C.A., Kasparcova V., Kallal L.A., Zeng X., Montoute M.N. et al. Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway. *PLoS One.* 2013; 8 (8): e69619.
- Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (7): 4812–8.
- Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yee C., Chen S. et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (21): 14 560–7.
- Tarasevich A., Filatov A., Pichugin A., Mazurov D. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virol.* 2015; 59 (3): 247–56.
- Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of mu-ropeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One.* 2016; 11 (8): e0160784.
- Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8 (11): 2281–308.
- Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J. et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
- Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29 (1): S49–52.
- Курсаков С.В., Кузнецова Е.Г., Курылева О.М., Саломатина Л.А., Гурьянова С.В., Борисова О. и др. Разработка и валидация методики определения глюкозаминилмурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Иммунология.* 2020; 41 (1): 74–82.
- Fosset S., Fromentin G., Rampin O., Lang V., Mathieu F., Tome D. Pharmacokinetics and feeding responses to muramyl dipeptide in rats. *Physiol. Behav.* 2003; 79 (2): 173–82.
- Fox A., Fox K. Rapid elimination of a synthetic adjuvant peptide from the circulation after systemic administration and absence of detectable natural muramyl peptides in normal serum at current analytical limits. *Infect. Immun.* 1991; 59 (3): 1202–5.

References

- Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (11): 8869–72.

2. Vinnitskiy L.I., Bunyatyan K.A., Pinegin B.V., Mironova E.V., Shvets L.I., Volkov A.A., et al. Domestic immunomodulator of a new generation, Licopid, in the comprehensive therapy and prevention of infectious complications in surgery. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 1997; (11): 46–9. (in Russian)
3. Bahr G.M., Darcissac E., Bevec D., Dukor P., Chedid L. Immunopharmacological activities and clinical development of muramyl peptides with particular emphasis on murabutide. *Int. J. Immunopharmacol.* 1995; 17 (2): 117–31.
4. Azuma I. Review: inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience. *Int. J. Immunopharmacol.* 1992; 14 (3): 487–96.
5. Kager L., Potschger U., Bielack S. Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 2010; 6: 279–86.
6. Kecek Plesec K., Urbancic D., Gobec M., Pekosak A., Tomasic T., Anderluh M., et al. Identification of indole scaffold-based dual inhibitors of NOD1 and NOD2. *Bioorg. Med. Chem.* 2016; 24 (21): 5221–234.
7. Wang S., Yang J., Li X., Liu Z., Wu Y., Si G., et al. Discovery of 1,4-benzodiazepine-2,5-dione (BZD) derivatives as dual nucleotide binding oligomerization domain containing 1/2 (NOD1/NOD2) antagonists sensitizing paclitaxel (PTX) to suppress Lewis lung carcinoma (LLC) growth in vivo. *J. Med. Chem.* 2017; 60 (12): 5162–92.
8. Rickard D.J., Sehon C.A., Kasparcova V., Kallal L.A., Zeng X., Montoute M.N., et al. Identification of benzimidazole diamides as selective inhibitors of the nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) signaling pathway. *PLoS One*. 2013; 8 (8): e69619.
9. Ogura Y., Inohara N., Benito A., Chen F.F., Yamaoka S., Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 2001; 276 (7): 4812–8.
10. Inohara N., Koseki T., del Peso L., Hu Y., Yee C., Chen S., et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (21): 14 560–7.
11. Tarasevich A., Filatov A., Pichugin A., Mazurov D. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virol.* 2015; 59 (3): 247–56.
12. Dagil Y.A., Arbatsky N.P., Alkhazova B.I., L'vov V.L., Mazurov D.V., Pashenkov M.V. The dual NOD1/NOD2 agonism of mu-ropeptides containing a meso-diaminopimelic acid residue. *PLoS One*. 2016; 11 (8): e0160784.
13. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8 (11): 2281–308.
14. Girardin S.E., Travassos L.H., Herve M., Blanot D., Boneca I.G., Philpott D.J., et al. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (43): 41 702–8.
15. Armbruster D.A., Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev.* 2008; 29 (1): S49–52.
16. Kursakov S.V., Kuznetsova E.G., Kuryleva O.M., Salomatina L.A., Gur'yanova S.V., Borisova O.Yu., et al. Development and validation of method for glucosaminylmuramyl dipeptide determining in aqueous solutions by high-performance liquid chromatography. *Immunologiya*. 2020; 41 (1): 74–82. (in Russian)
17. Fosset S., Fromentin G., Rampin O., Lang V., Mathieu F., Tome D. Pharmacokinetics and feeding responses to muramyl dipeptide in rats. *Physiol. Behav.* 2003; 79 (2): 173–82.
18. Fox A., Fox K. Rapid elimination of a synthetic adjuvant peptide from the circulation after systemic administration and absence of detectable natural muramyl peptides in normal serum at current analytical limits. *Infect. Immun.* 1991; 59 (3): 1202–5.

Сведения об авторах

Дагиль Юлия Алексеевна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: dagilya@petrovax.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9320-0789>

Пашенков Михаил Владимирович – д.м.н., и.о. заведующего лабораторией клинической иммунологии ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация; e-mail: mvpashenkov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>

Authors' information

Yuliya A. Dagil – PhD, Researcher of the Laboratory of Clinical Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: dagilya@petrovax.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9320-0789>

Mikhail V. Pashenkov – MD, Acting Head of the Laboratory of Clinical Immunology, NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation; e-mail: mvpashenkov@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6995-1790>