

УДК 575.164:577.27

## СЕПТИЧЕСКИЙ ШОК: ВРОЖДЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

© 2015 г. О. В. Курмышкина<sup>1</sup>, А. А. Богданова<sup>1</sup>, Т. О. Волкова<sup>1</sup>, А. Н. Полторак<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Петрозаводский государственный университет

185910 Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33

<sup>2</sup>Tufts University School of Medicine, Department of Pathology

150 Harrison Avenue, Boston, MA 02111

E-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.05.2014 г.

Окончательный вариант получен 29.01.2015 г.

Способность осуществлять иммунологический надзор и защиту от генетически чужеродных агентов – важнейшее свойство многоклеточного организма, в реализации которого все большее значение придается механизмам врожденного звена иммунитета. Накопленные сведения демонстрируют, что многие компоненты данных механизмов обладают чрезвычайно широким спектром биологических функций и играют незаменимую роль на самых разных этапах онтогенеза. Ярким примером является сигнальная система, активируемая фактором некроза опухолей альфа (ФНО $\alpha$ ) и составляющая основу воспалительного процесса. Изучение структурной организации этой системы показало, что сигнальные механизмы активации воспаления в значительной степени перекрываются с механизмами запрограммированной клеточной гибели. Именно поэтому гиперсекреция ФНО $\alpha$  может приводить к гибели организма в результате развития системной воспалительной реакции, или септического шока. Несмотря на длительную историю изучения, многие аспекты регуляции ФНО $\alpha$ -зависимого механизма остаются непонятны. Неизвестна природа различий в чувствительности к действию ФНО $\alpha$  у разных видов млекопитающих, не ясно, каким образом ФНО $\alpha$  может индуцировать противоположно направленные клеточные программы в зависимости от типа клеток или условий. Многочисленные данные, полученные с помощью разнообразных экспериментальных систем, требуют обобщения и критического анализа. Попыткой такого анализа является представленный обзор, в котором особое внимание уделено современным представлениями о дивергенции ФНО $\alpha$ -индуцированного сигнала на уровне внутриклеточных рецептор-ассоциированных белков. Приведено описание потенциальных “молекулярных триггеров”, контролирующих переключение между основными ФНО $\alpha$ -зависимыми сигнальными путями – воспалением, апоптозом и некроптозом. Охарактеризован вклад некроптоза – генетически запрограммированной некротической гибели клеток – в развитие системного воспаления и летальный эффект ФНО $\alpha$ . Также в статье рассматриваются различные линии мышей, обладающих естественной резистентностью/чувствительностью к действию ФНО $\alpha$ , с использованием которых в качестве модельных систем исследователи связывают большие надежды в расшифровке молекулярно-генетических основ регуляции врожденных иммунных реакций и других ФНО $\alpha$ -зависимых процессов.

*Ключевые слова:* воспаление, фактор некроза опухолей альфа, септический шок, некроптоз, мышечные модели, прямая генетика.

DOI: 10.7868/S0475145015040060

### ВВЕДЕНИЕ

Воспалительный ответ – врожденное (генетически обусловленное), эволюционно консервативное свойство, играющее важную роль в онтогенезе многоклеточного организма – поддержание его молекулярно-генетической целостности, биохимического и клеточного гомеостаза. Воспалительный процесс включает в себя разнообразные механизмы клеточной активации, связанные

с индукцией определенного спектра генов. Однако, как показывают исследования последних лет, многие индукторы и медиаторы активации клеток в ходе воспалительного ответа одновременно являются центральными регуляторами запрограммированной клеточной гибели, и поэтому их функционирование также важно для нормального морфогенеза и иммуногенеза на этапе эмбрионального развития. Ведущую роль в запуске вос-

палительной реакции играют фактор некроза опухолей альфа (ФНО $\alpha$ ) и его рецептор, которые, в зависимости от условий, могут активировать противоположные генетические программы – активацию клетки (“воспалительный путь”, “выживание”) или ее гибель. Существуют также контр-механизмы, в норме сдерживающие амплитуду и распространенность воспалительной реакции, но в определенных ситуациях они оказываются недостаточными – развивается системное воспаление, составляющее основу септического шока.

Несмотря на значительные успехи медицины в борьбе с инфекционными заболеваниями, сепсис и септический шок являются в высшей степени актуальной клинической и фундаментальной научной проблемой (Marshall, 2014). Развитие септического шока может быть вызвано не только прямым попаданием бактериальной инфекции в циркуляторное русло, но и, например, нарушением целостности стенки кишечника, в результате которого эндосимбиотические бактерии оказываются экспонированы макрофагам перитонеальной полости. Лавинообразный характер развития системного воспаления является причиной быстрой гибели организма. Статистика ежегодной смертности от последствий септического шока подтверждает актуальность данной проблемы (King et al., 2014).

Неконтролируемая гиперпродукция ФНО $\alpha$  макрофагами в результате взаимодействия с грамотрицательными бактериями или компонентами их клеточной стенки является пусковым фактором развития системной воспалительной реакции (King et al., 2014). Известно, что разные виды млекопитающих, а также линии лабораторных животных обладают различной чувствительностью к септическому шоку (Warren, 2009). В ряду данной чувствительности человек принадлежит группе высокочувствительных организмов. Подобные фенотипические вариации могут быть вызваны различными причинами, в частности, невосприимчивость к септическому шоку может быть связана как с устойчивостью к действию ФНО $\alpha$ , так и с дефектом в распознавании бактериальной инфекции и недостаточной выработкой ФНО $\alpha$ . Разработаны экспериментальные системы, позволяющие моделировать развитие септического шока, исследовать механизмы индукции ФНО $\alpha$  и его действия на другие ткани и органы. Полученные с помощью этих систем сведения указывают на то, что в основе фенотипических различий в отношении действия ФНО $\alpha$  лежат молекулярно-генетические особенности организма. На сегодняшний день известны многие компоненты ФНО $\alpha$ -активируемых реакций, однако, до сих пор остаются невыясненными причины сверхчувствительности организма человека. Существующая концепция ФНО $\alpha$ -опосре-

дованного сигнального пути не способна в полной мере объяснить всю сложность процесса и соответственно не может предсказать конечный результат. Модельные экспериментальные системы, описываемые далее, показали, что сигнальные механизмы, запускаемые ФНО $\alpha$  или приводящие к его гиперпродукции, значительно сложнее, чем считалось до недавнего времени. Очевидно, что в них вовлечены дополнительные, неизвестные ранее компоненты, выполняющие триггерную/ модулирующую функцию. Следовательно, дальнейшее изучение механизмов активации продукции ФНО $\alpha$  и его действия является крайне актуальной задачей современной иммунологии и иммуногенетики. Обнаружение новых факторов, определяющих скорость, интенсивность и варианты развития реакций септического шока, позволило бы выявить новые терапевтические мишени, способные нивелировать летальный эффект. Знание наследственно-генетических факторов, обуславливающих индивидуальную чувствительность к септическому шоку, предоставляет возможности для разработки диагностических и прогностических тест-систем, определения индивидуальных рисков и, возможно, профилактических мер. Актуальность изучения механизмов воспалительных реакций с участием ФНО $\alpha$  не ограничивается только лишь решением проблемы преодоления септического шока, так как ФНО $\alpha$  является цитокином плейотропного действия и нарушение регуляции ФНО $\alpha$ -зависимых реакций лежит в основе развития многих других патологических состояний человека (в частности, хронических воспалительных, аутоиммунных, онкологических заболеваний).

Для изучения молекулярно-генетических механизмов реализации врожденного иммунного ответа на инфекцию (в том числе, факторов, определяющих чувствительность/резистентность к септическому шоку) широко используются линии лабораторных мышей (Conner et al., 2009; Полтораки, 2012). Наличие инбредных мышинных линий, различающихся фенотипически в отношении противоинфекционного иммунитета, а также секвенированный и достаточно полно аннотированный геном мыши позволяют использовать классический генетический анализ для выявления генетических факторов, обуславливающих восприимчивость к бактериальной инфекции в целом и ФНО $\alpha$  в частности. Высокая степень гомологии и сходная организация мышинного генома и генома человека предоставляет возможность транслировать сведения, полученные в экспериментальных системах, на уровень клинических исследований (Mestas et al., 2004). Очевидно, что предрасположенность к септическому шоку в ходе иммунного ответа на инфекцию является сложным полигенным количественным признаком. Характер фенотипического проявления дан-

ного признака зависит не только от индивидуальной активности генов-участников, но и от межгенных взаимодействий и разнообразных условий. В связи с этим, использование инбредных линий мышей в качестве модельных объектов является особенно востребованным (Полторак, 2012).

Развитие системного воспалительного ответа – многоступенчатый процесс, поэтому фенотипическая устойчивость вида/подвида может быть связана с абсолютно разными генетическими изменениями (мутациями), затрагивающими различные его этапы. Особенно интересным представляется вариант, когда резистентный организм характеризуется интактным, полностью функциональным ФНО $\alpha$ -рецептором и продуцирует нормальный уровень ФНО $\alpha$  в ответ на инфекцию. Следовательно, в данном случае генетические изменения ассоциированы с некими “триггерными” механизмами, перенаправляющими сигнал от ФНО $\alpha$ -рецептора с цитотоксического пути на путь “выживания”.

В соответствии с вышеизложенным, цель настоящей обзорной статьи состояла в анализе литературы, посвященной изучению механизмов развития септического шока с использованием различных *in vitro* и *in vivo* модельных систем, и выявлении возможных генетических и биохимических факторов, обуславливающих резистентность или чувствительность к септическому шоку в мышиных моделях. Особое внимание уделено современным представлениям о дивергенции ФНО $\alpha$ -индуцированного сигнала на уровне внутриклеточных рецептор-ассоциированных адаптерных белков и ферментов как возможном механизме формирования резистентности к септическому шоку.

#### ИНДУКЦИЯ СЕКРЕЦИИ ФНО $\alpha$ КАК РЕЗУЛЬТАТ АКТИВАЦИИ ВРОЖДЕННОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА

Септический шок – сложное патофизиологическое состояние организма, представляющее собой генерализованный (системный) воспалительный процесс, вызванный бактеремией и/или массивным повреждением тканей (Kumar, 2014). Главная роль в первичном распознавании патогенов при развитии воспалительного ответа принадлежит звену врожденного иммунитета, в первую очередь макрофагам. Макрофаги имеют на своей поверхности инвариантные рецепторы (PRR, или *pattern-recognition receptors*), способные связывать высококонсервативные химические структуры, общие для большинства групп микроорганизмов, так называемые патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, или PAMPs. Некоторые PRR, согласно функциональной классификации, являются “сигнальными рецепторами”, так как их взаимодействие с PAMPs индуцирует

экспрессию специфических генов, отвечающих за продукцию про-воспалительных сигнальных молекул в очаге инфекции (Schenten et al., 2011).

Ключевым активатором функций макрофагов в ходе иммунного ответа на грамотрицательные бактерии является бактериальный липополисахарид (ЛПС, или эндотоксин), принадлежащий группе PAMP-соединений (Cho et al., 2014). Специфическое распознавание ЛПС макрофагами осуществляется через TLR4 рецептор, относящийся к семейству эволюционно консервативных Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR). TLR4 был первым представителем данного семейства, обнаруженным у млекопитающих в экспериментах по идентификации гена, определяющего устойчивость к септическому шоку у различных мутантных линий лабораторных мышей (Полторак, 2012). Строение TLR4 соответствует его функции сигнального PRR: цитоплазматический домен TLR4 содержит TIR-последовательности (Toll-interleukin-1-receptor), способные взаимодействовать со спектром адаптерных цитоплазматических белков. Мутации (спонтанные или индуцированные), приводящие к аминокислотным заменам в TIR-домене, определяют высокую предрасположенность к бактериальному заражению и, в то же время, устойчивость к инъекции эндотоксина у некоторых линий мышей.

Согласно утвердившимся представлениям, сигнал от TLR4-рецептора может распространяться по двум путям – “MyD88-зависимому” и “MyD88-независимому/TRIF-зависимому”. Первый путь приводит к активации генов про-воспалительных цитокинов, а второй – интерферонов I типа. Несмотря на то, что многие компоненты этих сигнальных каскадов охарактеризованы, до сих пор остается невыясненным, каким образом осуществляется “переключение” между ними, приводящее к продукции двух разных спектров цитокинов. В проведении “MyD88-зависимого” сигнала задействованы протеинкиназы IRAK, убиквитин-лигаза TRAF6 и TAK1-киназа, активирующая транскрипционный фактор NF $\kappa$ B или MAP-киназы (“воспалительный” и “pro-survival” путь). В случае “TRIF-зависимого” пути, сигнал передается на IRF-факторы, взаимодействующие с ISRE-элементами генов-мишеней (Brikos et al., 2008). Для некоторых TLR (в том числе TLR4) возможно также переключение сигнала на путь запрограммированной клеточной гибели.

Ключевым, с точки зрения проблемы развития септического шока (“цитокинового шторма”), продуктом TLR4-опосредованной MyD88-зависимой активации макрофагов является ФНО $\alpha$  (Shuh et al., 2013). ФНО $\alpha$ , совместно с интерлейкинами (ИЛ) -1 и -6, составляют “триаду” главных про-воспалительных цитокинов, однако, следует подчеркнуть чрезвычайную плейотропность действия ФНО $\alpha$ . В зависимости от типа

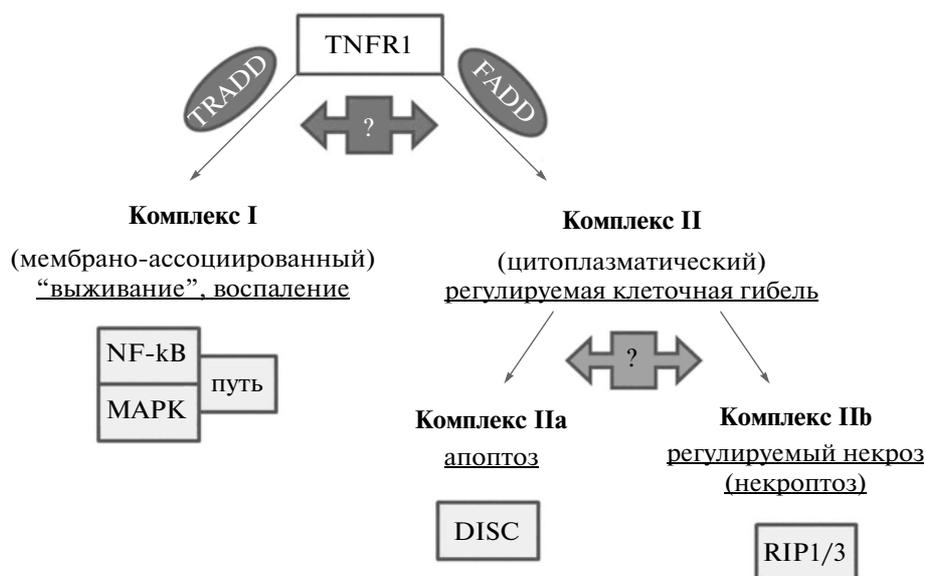


Рис. 1. Схема дивергенции сигнала при активации TNFR1.

клеток-мишеней, их текущего состояния и микроокружения, ФНО $\alpha$  может оказывать как цитоактивирующий, так и цитотоксический эффект. В норме, при невысокой “дозе” патогена, иммунные реакции, запускаемые макрофагами, имеют преимущественно локальный характер и ФНО $\alpha$  функционирует как ауто- или паракринный регулятор. При системном воспалении, в результате массивной активации макрофагов, концентрация ФНО $\alpha$  в циркуляторном русле может увеличиваться до критических значений. Системный физиологический эффект ФНО $\alpha$  проявляется в гипотензии, гипотермии, гипопроотеинемии, диссеминированной интраваскулярной коагуляции, многочисленных метаболических нарушениях. Летальное действие обусловлено некротическими изменениями внутренних органов, острой полиорганной недостаточностью, внутренними кровотечениями (King et al., 2014). Таким образом, если ЛПС является индуктором/триггером системного воспалительного процесса, то ФНО $\alpha$  является его ключевым медиатором. На клеточном уровне действие ФНО $\alpha$  определяется особенностями функционирования ФНО $\alpha$ -рецепторного комплекса.

#### ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФНО $\alpha$ -РЕЦЕПТОРА

**Строение рецепторного комплекса и компоненты ФНО $\alpha$ -зависимого сигнального каскада.** ФНО $\alpha$ -рецептор (TNFR) является прототипом обширного суперсемейства “рецепторов клеточной смерти” (Death Receptors), насчитывающего на данный момент более 20 представителей.

Идентифицировано два типа ФНО $\alpha$ -рецептора в клетках млекопитающих: TNFR1 и TNFR2. TNFR1 (p55) обнаруживается фактически на всех типах клеток организма человека и является основным сигнальным рецептором для ФНО $\alpha$ , в то время как экспрессия TNFR2 (p75) ограничена в основном клетками иммунной системы, и биологическая роль данного рецептора точно не известна (Naudé et al., 2011).

Активация TNFR1 может индуцировать разнообразный биологический ответ – как выживание клетки-мишени, ее пролиферацию и активацию про-воспалительных генов (“*NFkB*-путь”), так и наоборот, клеточную гибель по апоптотическому или некротическому пути (рис. 1). Конечный результат, согласно современной модели ФНО $\alpha$ -зависимой активации, определяется спектром вторичных посредников (адаптерных белков и протеинкиназ), воспринимающих сигнал от TNFR1, относительным уровнем их экспрессии и локализацией рецепторного комплекса в определенном мембранном компартменте клетки.

Индукцированная ФНО $\alpha$  тримеризация TNFR1 приводит к сближению цитоплазматических DD-доменов (Death Domain) рецептора, после чего с ними способны взаимодействовать белки-адаптеры, также содержащие гомологичные DD-домены: TRADD (TNFR-Associated Death Domain) и FADD (Fas-Associated Death Domain) (рис. 1). Модель передачи сигнала от активированного TNFR1, принятая на сегодняшний день, предполагает возможность формирования сигнальных супрамолекулярных комплексов двух типов. Комплекс I (“проксимальный”) направляет сигнал по пути “выживания” и иммунного вос-

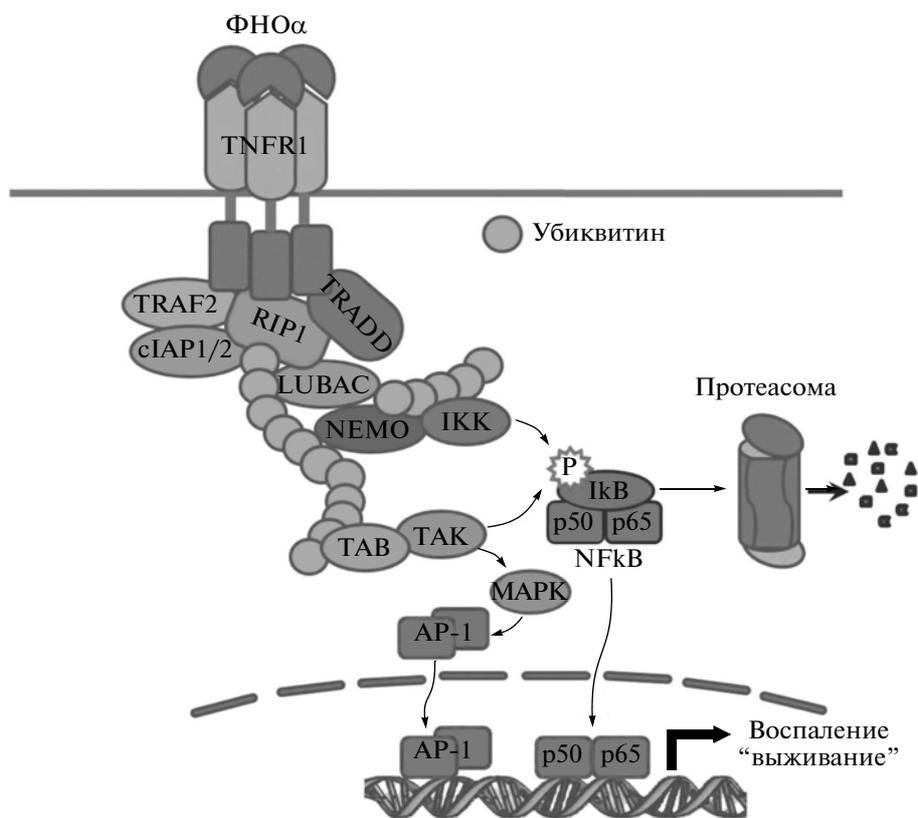


Рис. 2. Передача ФНО $\alpha$ -сигнала через Комплекс I.

паления, а Комплекс II – по пути генетически запрограммированной клеточной гибели. Следует отметить, что до сих пор остается невыясненным механизм “переключения” сигнального каскада между этими двумя комплексами (Vanlangenakker et al., 2012; Moriwaki et al., 2013).

В состав Комплекса I, ассоциированного с “выживанием” и воспалением, входят: адаптер TRADD, белки-ингибиторы апоптоза cIAPs и фактор TRAF2 (семейство E3 убиквитин-лигаз), а также рецептор-ассоциированная сигнальная киназа RIP1 (рис. 2) (Vanlangenakker et al., 2011). Предполагается, что выбор дальнейшего пути передачи сигнала зависит от активности RIP1-киназы, которая определяется степенью ее убиквитинирования. В составе Комплекса I TRAF2 и cIAP1/2 катализируют линейную полимеризацию убиквитина по остаткам Lys63 RIP1-киназы. Такая модификация не связана с протеасом-зависимой деградацией, но выполняет регуляторную функцию. Как полагают на данный момент исследователи, присоединение полиубиквитиновых цепей к RIP1-киназе, с одной стороны, подавляет ее каталитическую (киназную) активность и предотвращает переключение сигнала на путь клеточной гибели. С другой стороны, полиу-

биквитиновые цепи RIP1-киназы выполняют функцию “молекулярного каркаса” (molecular scaffold) для сборки и активации специфических протеинкиназ (TAK1, IKK), которые фосфорилируют IκB (ингибитор NFκB) и тем самым направляют его на протеасом-зависимую деградацию (рис. 2). Активированный NFκB (p65:p50) перемещается из цитоплазмы в ядро и взаимодействует с регуляторными последовательностями многочисленных генов-мишеней, отвечающих за клеточную активацию, пролиферацию, ингибирование апоптоза и воспалительный ответ.

Выявлены дополнительные убиквитин-зависимые белковые компоненты, облегчающие активацию TAK1 и IKK комплексов и тем самым потенцирующие NFκB-путь. Так, полиубиквитиновый скэффолд RIP1-киназы необходим для связывания регуляторной субъединицы IKK-киназы NEMO (рис. 2). Одновременно RIP1-скэффолд используется для рекрутирования и активации LUBAC убиквитин-лигазного комплекса. LUBAC наращивает убиквитиновые цепи на NEMO, которые в целом способствуют стабилизации Комплекса I и служат “площадкой” для прикрепления IKK-комплекса (Emmerich et al., 2011). Белки TAB2 и TAB3 содержат убиквитин-связыва-

ющие домены и выполняют функцию адаптеров, облегчающих взаимодействие TAK1-киназного комплекса (TAK1:TAB1) с RIP1-киназой (Broglie et al., 2010). Через TRAF2 и TAK1 ФНО $\alpha$ -сигнал может также передаваться на терминальные MAP-киназы (p38 MAPK, JNK и ERK1/2) и, в конечном итоге, на транскрипционный фактор AP-1, мишенями которого являются различные пролиферативные гены и гены, необходимые для выживания клетки при действии стрессогенных факторов (Shuh et al., 2013).

Таким образом, образование RIP1-полиубиквитинового молекулярного каркаса является ключевым условием формирования Комплекса I. Однако последние исследования RIP1-нокаутных клеток ставят под сомнение абсолютную значимость RIP1 для активации NF $\kappa$ B-пути, указывая на возможное участие других убиквитинированных белков в составе Комплекса I, способных рекрутировать и активировать TAB:TAK1 и IKK $\alpha$ :IKK $\beta$ :NEMO комплексы (Vanlangenakker et al., 2011). Негативными регуляторами стабильности рецептор-ассоциированного Комплекса I являются деубиквитиназы A20 и CYLD (cylindromatosis), редактирующие длину убиквитиновых цепей рецептор-проксимальных сигнальных белков. Исследователи предполагают существование сложного комбинаторного убиквитинового кода, который является результатом согласованного действия различных убиквитинлигаз и деубиквитиназ и который предопределяет вероятность проведения сигнала по NF $\kappa$ B-пути или по пути клеточной гибели (Hymowitz et al., 2010). Однако данное предположение требует дополнительных экспериментальных подтверждений.

**“Внешний” (рецептор-зависимый) путь апоптоза и формирование Комплекса II (IIa).** Апоптоз – генетически контролируемый механизм клеточной гибели, сопровождающийся характерными цитоморфологическими и биохимическими изменениями, а также активацией специфических групп генов (Rossi et al., 2003). Известны многочисленные вне- и внутриклеточные факторы, запускающие апоптотическую программу, реализация которой осуществляется, в большинстве случаев, посредством внутриклеточных цистеиновых протеиназ – каспаз (EC 3.4.22). Взаимодействие “лигандов и рецепторов клеточной смерти” (представителей ФНО-суперсемейства) является основным способом индукции “внешнего” пути апоптоза. При этом функцию адаптерного белка, взаимодействующего с DD-доменами рецептора, выполняет FADD. Кроме DD-домена, FADD содержит также DED-домен (Death Effector Domain), необходимый для образования DISC комплекса (death-inducing signalling complex). DISC служит “платформой” для мультимеризации и автокаталитической активации инициаторной прокаспазы-8. Взаимодействие FADD с прокаспазой-8 основано на гомотипических взаимодействиях их

DED-доменов. Далее каспаза-8 осуществляет процессинг эффекторных каспаз, не имеющих DED-домена и не способных поэтому воспринимать сигнал непосредственно от “рецептора смерти”. Формирование активного DISC-комплекса может подавляться эндогенным конкурентным ингибитором cFLIP, который является структурным аналогом каспазы-8, но не обладает протеазной активностью (Lavrik et al., 2012).

В результате многочисленных исследований данная “классическая” схема рецептор-опосредованной активации апоптотического каскада значительно усложнилась. Молекулярные процессы, вызванные действием на клетки ФНО $\alpha$ , в сравнении с CD95L или TRAIL, имеют ряд особенностей. При ФНО $\alpha$ -зависимой передаче сигнала сначала происходит формирование рецептор-проксимального Комплекса I, который в случае деубиквитинирования RIP1-киназы дестабилизируется и диссоциирует от TNFR1 в цитоплазму с образованием Комплекса II (рис. 3). За отщепление убиквитиновых мономеров отвечают CYLD и A20. Также укорочение полиубиквитиновых цепей возможно при ингибировании cIAPs, например, при активации митохондриального фактора Smac/DIABLO или действия Smac-миметиков (Moquin et al., 2013). RIP1-киназа, лишенная полиубиквитинового хвоста, способна ассоциировать с адаптером FADD, который связывает прокаспазу-8.

Таким образом, про-апоптотический Комплекс II образуют белки FADD, RIP1, прокаспаза-8, а также cFLIP. Именно в составе этого комплекса происходит активация каспазы-8, далее она расщепляет RIP-киназы и CYLD-белок, предотвращая развитие некроптоза (RIP-зависимой клеточной гибели) и направляя клетку на путь апоптоза (рис. 3). Однако установлено, что степень активации каспазы-8 в составе Комплекса II, а, следовательно, и направление сигнала по пути апоптоза/некроптоза/выживания, сложным образом зависит от уровня экспрессии cFLIP и, по-видимому, от баланса его “короткой” и “длинной” изоформ, которые в разной степени подавляют протеолитическую активность каспазы-8. Как было сказано выше, cFLIP конкурирует с прокаспазой-8 за связывание с FADD. Соответственно, при низком уровне cFLIP прокаспаза-8 образует гомодимеры и активируется по автокаталитическому механизму, индуцируя апоптоз. При высоком уровне экспрессии cFLIP образует гетеродимеры с прокаспазой-8, блокируя ее активацию. Однако установлено, что cFLIP по такому механизму подавляет не только каспаз-зависимый апоптоз, но и каспаз-независимый RIP-зависимый некроз, вероятно путем дестабилизации комплекса FADD:RIP1:RIP3. Таким образом, cFLIP является одним из триггеров между “выживанием” клетки и ее гибелью (как апоптотиче-

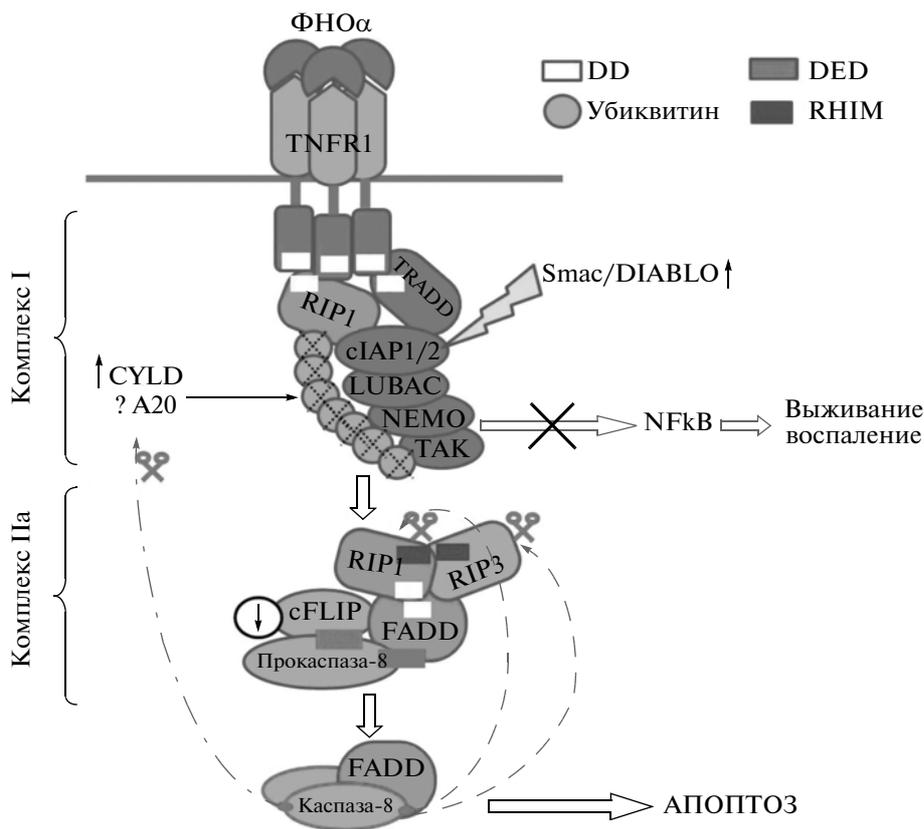


Рис. 3. Схема сборки Комплекса II (IIa). Прямоугольниками изображены функциональные домены, опосредующие белок-белковые взаимодействия.

ской, так и некротической) (Giampietri et al., 2014).

Несмотря на значительный прорыв в понимании механизмов индукции рецептор-опосредованного апоптоза, до сих пор точно не установлено, какие именно сигналы играют роль “переключателей” между Комплексами I и II *in vivo* (Christofferson et al., 2010; Vanlangenakker et al., 2011). Очевидно, в определении клеточной “судьбы” (выживание/гибель) большое значение имеет баланс между: а) убиквитин-лигазами и деубиквитириназами; б) относительным уровнем экспрессии каспаз и их эндогенных ингибиторов или активаторов. Роль RIP1-киназы в формировании Комплекса IIa не может считаться до конца установленной, так как в определенных случаях подавление ее экспрессии, наоборот, стимулирует образование про-апоптотического комплекса. Каждый тип клеток, предположительно, характеризуется своим профилем относительной экспрессии этих компонентов, что объясняет высокую тканеспецифичность ответа на действие ФНОα. Также активно обсуждается роль компартиментализации ФНОα-рецепторного комплекса и его липидного микроокружения (включения в специфические мембранные микродоме-

ны, или рафты) в определении его белкового состава и функционирования (Schütze et al., 2008).

### НЕКРОПТОЗ – “АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ” ПУТЬ ФНОα-ИНДУЦИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ

Традиционно выделяют два варианта клеточной гибели – некроз и апоптоз. Под некрозом понимают пассивную, случайную гибель клеток, сопровождающуюся нарушением целостности плазматической мембраны и выходом содержимого цитоплазмы в межклеточное пространство, при этом, не происходит межнуклеосомной фрагментации ДНК (Wu et al., 2012). Однако, как оказалось, в определенных случаях некротическая гибель клетки может быть сопряжена с активацией вполне определенных ферментов и может регулироваться на генетическом уровне (Linkermann et al., 2014). Более того, с помощью различных экспериментальных систем было показано, что в условиях полной блокировки активности каспаз (синтетическими пептидными аналогами или ингибиторами вирусного происхождения) действие на клетки “лигандов смерти” может ин-

дуцировать их гибель с характерными цитологическими признаками некроза (Verzammen et al., 1998). Если совместно с ингибиторами каспаз обработать клетки ингибиторами белков, активирующихся при некрозе, то только в этом случае развивается устойчивость к таким факторам клеточной гибели, как, например, цитокины ФНО $\alpha$ -семейства. Таким образом, существует каспаз-независимая, но генетически запрограммированная клеточная гибель по типу некроза, которая получила название “некроптоз”.

Программируемый некроз, как и апоптоз, может быть вызван различными стимулами (генотоксический стресс, гипоэнергетические состояния, нарушение Ca<sup>2+</sup>-гомеостаза, потеря трансмембранного потенциала, деполяризация митохондрий, гиперпродукция активных форм кислорода и т.п.). Активация некоторых рецепторов клеточной поверхности (TNFR1, TNFR2, TRAILR1, TRAILR2, TLR3,4) также может индуцировать клеточную гибель по некротическому типу (Linkermann et al., 2014). Для описываемой в данной статье проблемы септического шока наибольшее значение имеет TNFR-опосредованный некроз. Следует отметить, что ФНО $\alpha$  был идентифицирован именно как фактор, вызывающий быстрый геморрагический некроз опухолей у мышей (Cargwell et al., 1975). Широко используемой *in vitro* моделью TNFR-зависимого некроптоза является гибель L929 клеток мышинной фибросаркомы при обработке ФНО $\alpha$ . Некроптоз лежит в основе патогенеза многих хронических и острых воспалительных процессов (ишемическая болезнь сердца, отслоение сетчатки, атопический дерматит, болезнь Крона, острый панкреатит и др.) (Linkermann et al., 2014). В представленном обзоре мы акцентируем внимание на роли некроптоза в развитии ФНО $\alpha$ -индуцированного системного воспалительного ответа (септического шока) и разработке экспериментальных модельных систем для его изучения.

**Формирование некроптоз-ассоциированного Комплекса IIb.** В процессе изучения молекулярных механизмов ФНО $\alpha$ -зависимого некроптоза исследователи пришли к выводу, что наиболее вероятным его триггером является RIP3-киназа, поэтому некроптоз называют RIP3-зависимой клеточной гибелью (в противопоставление каспаз-зависимой). Тем не менее, RIP1-киназа также является неотъемлемым участником и регулятором каскада некроптоз-ассоциированных событий (He et al., 2009). Изучению механизма индукции некроптоза способствовало обнаружение аллостерического ингибитора RIP1-киназы — некростатина-1 (Nec-1), специфически подавляющего ее киназную активность и не влияющего на функционирование RIP-1 в качестве молекулярной полиубиквитиновой платформы. В различных *in vitro* и *in vivo* системах предварительная

обработка клеток Nec-1 предотвращала ФНО $\alpha$ -индуцированную гибель, но не влияла на способность ФНО $\alpha$  активировать NF $\kappa$ B-путь. Следовательно, именно киназная активность RIP1, определяемая степенью ее убиквитинирования, важна для переключения ФНО $\alpha$ -сигнала на путь клеточной гибели, и, в отсутствие активной каспазы-8, этот сигнал передается на RIP3 и приводит к некроптозу. Необходимо отметить, что по-прежнему компонентный состав сигнального пути некроптоза и функции каждого компонента остаются в значительной степени неизвестными, поэтому не прекращается поиск и разработка новых специфических ингибиторов, которые позволили бы его исследовать (например, некросульфонамид является ингибитором псевдокиназы MLKL человека — одного из компонентов некрсомы); большие надежды связывают с применением этих ингибиторов в качестве лекарственных средств (Linkermann et al., 2014).

Начальным этапом TNFR-индуцированного некроптоза является формирование *некрсомы*, которая представляет собой амилоидо-подобный цитоплазматический комплекс [RIP1K:RIP3K:MLKL], или **Комплекс IIb** (рис. 4). Деубиквитинирование RIP1-киназы предположительно освобождает ее RHIM домен для взаимодействия с гомологичным доменом RIP3-киназы. В комплексе с RIP3-киназой, RIP1 аутокаталитически активируется и фосфорилирует RIP3, которая далее активирует белки эффекторной фазы некроптоза (Moriwaki et al., 2013). Как уже было отмечено, спектр этих эффекторных белков во многом неизвестен. Предположительно в состав некрсомы включаются MLKL-псевдокиназа, митохондриальные белки фосфолипидатмутаза PGAM5s и динамин-подобный Dpr1, активация которых связана с повышенной продукцией активных форм кислорода. RNAi-сайленсинг MLKL подавляет некроз в модельных системах, аналогично нокдауну RIP1 и RIP3 киназ, что указывает на ее центральную роль в каскаде некроптоз-ассоциированных реакций (Remijnsen et al., 2014). Отметим, что RHIM домены обнаружены в составе еще двух белков: DAI и TRIF. DAI интегрирует сигналы от различных внутриклеточных сенсоров вирусной инфекции; TRIF выполняет функцию цитоплазматического адаптера TLR3 и TLR4 рецепторов. Соответственно, распознавание вирусной или бактериальной инфекции может сопровождаться формированием некрсомы и активацией RIP-зависимого некроптоза (Linkermann et al., 2014).

Открытым остается главный вопрос о механизме “переключения” между апоптозом и некроптозом, т.е. между Комплексами IIa и IIb. Важным обстоятельством для формирования некрсомы является не только относительная активность деубиквитираз и убиквитин-лигаз, но и уровень активности каспазы-8. Сборка некросо-

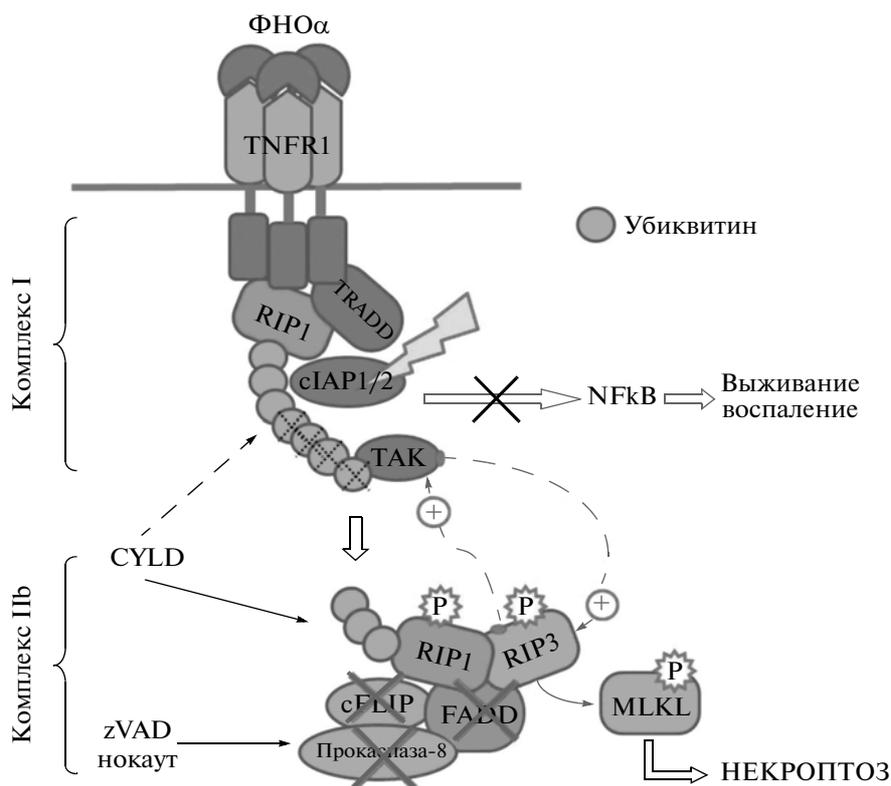


Рис. 4. Схема сборки Комплекса IIb (некрсомы).

мального комплекса становится возможной, если по каким-либо причинам процесс активации каспазы-8 заблокирован (например, при обработке клеток панкаспазным ингибитором zVAD), либо каспаза-8 не экспрессируется на должном уровне. Именно в этом случае RIP-киназы и деубиквитиназа CYLD остаются интактными, и в то же время RIP1 сохраняет свою киназную активность.

Необходимо подчеркнуть, что при развитии некроптоза каспаза-8 выполняет защитную функцию – блокирует сборку некрсомы. К этому важному выводу помогли прийти эксперименты с нокаутными мышами. Оказалось, что делеция по каспазе-8, FADD или cFLIP является летальной (мыши гибнут на ранних этапах эмбриогенеза), однако, двойные нокауты по какому-либо из этих трех генов и по RIP3-киназе вполне жизнеспособны. Следовательно, эмбрионы погибают от RIP3-индуцированной клеточной смерти, а комплекс [каспаза-8:FADD:cFLIP] является ее антагонистом (Kaiser et al., 2011; Zhang et al., 2011). Таким образом, ингибирование некроза является ключевой неапоптотической функцией каспазы-8. В противоположность каспазе-8, деубиквитиназа CYLD является стимулятором некроптоза: ее возможная триггерная роль подтверждается экспериментами по нокауту *cyld*-

гена, подавляющему некротическую гибель клеток. У лабораторных мышей тканеспецифичный нокаут FADD в клетках эпидермиса приводит к развитию тяжелых некротических поражений кожи и воспаления, однако, при скрещивании их с мышами, мутантными по деубиквитиназной активности CYLD, нормальный фенотип восстанавливается (Moquin et al., 2013). Тем не менее, триггерное значение CYLD требует дополнительных экспериментальных подтверждений, так как не во всех случаях подавление его активности “переключает” некроптоз на апоптоз. Возможно, CYLD регулирует динамику сборки RIP1/RIP3-комплекса, но не определяет саму возможность его формирования (Moquin et al., 2013).

Результаты исследований (Morioka, 2014) и (Dondelinger et al., 2013) указывают на возможную роль TAK1-киназы в качестве молекулярного “переключателя” между апоптозом и некроптозом при действии ФНО $\alpha$ . Установлено, что TAK1-киназа, которая является компонентом TNFR-проксимального комплекса (Комплекса I), может непосредственно активировать RIP3-киназу и запускать клеточную гибель по типу некроза, а подавление активности TAK1 вызывает каспазозависимый апоптоз, независимо от наличия или отсутствия RIP3.

В литературе также ставится вопрос о значении других пост-трансляционных модификаций RIP-киназ, помимо убиквитинилирования и фосфорилирования, для “выбора” пути распространения ФНО $\alpha$ -сигнала. Например, обнаружено, что деацетилирование остатка Lys530 RIP1-киназы под действием деацетилазы SIRT2 стабилизирует RIP1–RIP3 комплекс и усиливает ФНО $\alpha$ -зависимый некроз в модели *in vitro* (Narayan et al., 2012), однако, установление роли SIRT2 в регуляции некроптоза *in vivo* требует дополнительных исследований (Moriwaki et al., 2013; Newton et al., 2014).

Следует ожидать, что будут идентифицированы новые белковые регуляторы ФНО $\alpha$ -зависимого сигнального пути или установлены новые функции уже известных компонентов. Необходимо отметить, что в большинстве экспериментальных систем для определения роли какого-либо компонента в ФНО $\alpha$ -сигналинге используется тот или иной способ его инактивации. Однако это далеко не всегда приближает к пониманию того, каким образом осуществляется ФНО-зависимая регуляция в естественных живых системах при развитии патологического процесса, когда все участники сигнального пути остаются функционально активными (по крайней мере, потенциально). Каким образом происходит “принятие решения” на клеточном уровне в отсутствие каких-либо ингибиторов? Исследования последних лет свидетельствуют о невероятной гибкости данного регуляторного механизма и его высокой тканеспецифичности. Как показывают результаты, функции многих его участников в значительной мере перекрываются, являясь избыточными; в зависимости от условий и от типа клеток, разные компоненты могут заменять друг друга. Поэтому следует учитывать, что представленные выше схемы могут описывать частные случаи и лишь приближенно отражают весь регуляторный потенциал ФНО $\alpha$ -зависимого механизма. При попытке обобщить результаты, полученные разными исследовательскими группами, можно столкнуться с высокой степенью противоречивости данных, которая, вероятнее, всего объясняется использованием в качестве модельных систем различных типов клеток и различных условий.

Так, например, появляются данные о том, что RIP1-киназа не является облигатным компонентом ФНО $\alpha$ -зависимого каскада, ведущего к клеточной гибели по пути некроптоза или апоптоза (Moriwaki et al., 2013; Mouchalled et al., 2013). Некоторые результаты позволяют сделать вывод о том, что хотя RIP1 и RIP3 и являются ключевыми участниками механизма некроптоза, они не выполняют функцию триггеров между апоптозом и некроптозом при действии ФНО $\alpha$  (Kaczmarek et al., 2013; Remijns et al., 2014). Возможно, опре-

деляющее значение имеет отношение уровня экспрессии RIP3 к уровню RIP1.

**Роль некроптоза в развитии системного воспалительного ответа.** Вопрос о вкладе RIP1/RIP3-некроптоза в развитие септического шока и его летальный эффект по-прежнему остается дискуссионным, несмотря на ряд значимых экспериментальных свидетельств, полученных за последнее время (Linkermann et al., 2012). Важно отметить тот факт, что гибель клеток по механизму некроптоза, в отличие от апоптоза, вследствие нарушения целостности плазмалеммы сопровождается выходом в межклеточное пространство высокоиммуногенных цитоплазматических белков, называемых DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Kaczmarek et al., 2013). DAMPs могут быть распознаны PRR-рецепторами макрофагов и тем самым способны еще сильнее активировать (амплифицировать) реакции врожденного иммунитета, уже запущенные бактериальной инфекцией (ЛПС, ФНО $\alpha$ ), приводя к развитию “цитокинового шторма” (септического шока) (Linkermann et al., 2014).

В работе (Duprez et al., 2011) на мышинной модели “стерильного” сепсиса получены доказательства того, что при септическом шоке гибель организма обусловлена в первую очередь ФНО $\alpha$ -индуцированным некроптозом гепатоцитов. Также с помощью технологии генного нокаута авторами выявлена *in vivo* роль RIP3-киназы в промотировании системного воспаления и защитное действие каспазы-8: RIP3(–/–) мыши проявляли абсолютную резистентность к инъекции ФНО $\alpha$ , а инъекция WT (wild type) мышам панкаспазного ингибитора zVAD, наоборот, усиливала летальный эффект ФНО $\alpha$ . Гистологический анализ показал отсутствие каких-либо некротических изменений в печени животных, нокаутных по RIP3-киназе, в сравнении с WT особями. Также у RIP3(–/–) мышей после инъекции ФНО $\alpha$  не наблюдалось значительного повышения уровня циркулирующих DAMPs, что подтверждает отсутствие некротического поражения внутренних органов. Интересно, что генный нокаут эффекторных каспаз-3, -7 и воспалительной каспазы-1 не влиял на показатели смертности мышей при индукции септического шока. Следовательно, летальность действия ФНО $\alpha$  и сенситизирующий эффект zVAD определяется именно на уровне инициаторной каспазы-8, т.е. на уровне “переключения” сигнала между апоптозом и некрозом в гепатоцитах. Также нокаут RIP3 устранял летальный эффект ФНО $\alpha$  при моделировании сепсиса методом лигирования-пункции слепой кишки, что подтверждает универсальность предложенной концепции (Duprez et al., 2011). При изучении динамики изменения уровня про-воспалительных цитокинов было показано, что если в течение первых 2 ч после инъекции ФНО $\alpha$  уро-

вень ИЛ-1 и ИЛ-6 в крови RIP3(-/-) особей увеличивался в той же степени, что и у WT мышей, то через 6 ч концентрация данных цитокинов была значительно ниже у нокаутов. Из данного наблюдения следует два вывода: а) у RIP3(-/-) мышей про-воспалительный NFkB-путь остается интактным, так как RIP3-киназа в нем не задействована (рис. 2); б) стабильно высокий уровень воспалительных цитокинов у WT мышей, вероятнее всего, является результатом “вторичного” ответа на повышение концентрации DAMPs, вызванное некротической гибелью клеток, нежели результатом первичной активации макрофагов при действии ФНО $\alpha$ . Эти данные еще раз подчеркивают физиологическую значимость типа клеточной гибели: именно при некроптозе формируется положительная “обратная петля”, амплифицирующая воспалительные реакции. В статье (Duprez et al., 2011) авторы приводят свидетельства о “защитном” действии Nec-1 при моделировании септического шока *in vivo*, однако, другими исследователями эти результаты оспариваются (Linkermann et al., 2012).

Поражение слизистой кишечника также является характерным процессом, сопровождающим ФНО $\alpha$ -индуцированный септический шок, однако, в данном случае эпителиоциты погибают по механизму апоптоза. Это подтверждается как цитоморфологическим анализом, так и результатами генного нокдауна: именно делеция каспазы-3, но не RIP3-киназы, предотвращала повреждение кишечного эпителия при инъекции ФНО $\alpha$ . Учитывая, что RIP3(-/-) мыши выживают при индукции септического шока, можно предполагать, что поражение кишечного эпителия не является ведущей причиной гибели организма (Duprez et al., 2011). Интересным представляется тот факт, что кондиционные нокауты, не экспрессирующие FADD или каспазу-8 в энтероцитах, характеризуются высокой частотой спонтанного некроза этих клеток и повышенным уровнем экспрессии RIP3. Инъекция ФНО $\alpha$  у таких животных также индуцирует некроз клеток кишечного эпителия, хотя в WT мышцах, как сказано выше, ФНО $\alpha$ -сигнал запускает апоптоз (Galluzzi et al., 2011; Welz et al., 2011). Вероятно, такая высокая избирательность разных тканей при определении пути клеточной гибели в ответ на один и тот же стимул (ФНО $\alpha$ ) и в отсутствие каких-либо экзогенных ингибиторов или вмешательств на генном уровне, определяется естественным внутриклеточным “молекулярным контекстом”.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЫШИНЫХ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ КОМПОНЕНТОВ ЛПС-/ФНО $\alpha$ -ИНДУЦИРОВАННОГО СЕПТИЧЕСКОГО ШОКА

Резистентность/чувствительность к септическому шоку – это сложный, полигенный количественный признак, в основе которого лежит многоступенчатый и многокомпонентный процесс развития воспалительного ответа. Для того чтобы иметь возможность управлять этим процессом (при терапевтических мероприятиях, при разработке лекарственных препаратов и т.п.), необходимо выявить максимальное количество генов, в него вовлеченных, и установить их непосредственные функции. Наличие естественных подвидов или лабораторных чистых линий организмов одного вида, дискретно различающихся по степени резистентности к септическому шоку, позволяет изучать, какие белки и какие регуляторные механизмы отвечают за его развитие, применяя метод “прямой” генетики. Данный подход основан на скрещивании организмов с противоположными проявлениями признака и анализе фенотипа в ряду поколений полученного потомства. Главное внимание при данном подходе отводится анализу рекомбинационных событий, так как они позволяют картировать признак, т.е. определить участок хромосомы, содержащий искомый ген(-ы). Статистически достоверная корреляция между генотипом и фенотипом подтверждает участие предполагаемого генетического локуса в проявлении изучаемого признака (Полтораки, 2012).

Удобной моделью для изучения молекулярно-генетических механизмов, контролирующих развитие иммунного ответа, являются классические инбредные (чистые) линии мышей. Достоинством данной модельной системы является то, что фенотипы чистых линий подробно изучены и имеются линии, которые по определенным фенотипическим характеристикам очень близки организму человека. Для генетического анализа с использованием мышиных моделей детально разработаны панели микросателлитных маркеров, позволяющих проводить полногеномное генотипирование особей. Однако при использовании стандартных чистых линий в классическом генетическом анализе с целью обнаружения новых генов, исследователи сталкиваются с проблемой поиска линий с противоположно отличающимися фенотипами по изучаемому признаку. Данная проблема связана с ограниченным генетическим разнообразием классических чистых линий мышей, поскольку большинство из них выведено из единого природного подвида *Mus musculus domesticus*. В этой связи особую ценность представляют линии мышей, полученные из диких подвидов/видов, которые дивергировали более 1 млн лет назад (Conner et al., 2009). По результатам анализа различных генетических и биохимических маркеров, вид

*Mus musculus* был разделен на три подвида — *M. m. domesticus*, *M. m. castaneus*, *M. m. musculus* (Moriwaki et al., 2009). *Mus m. domesticus* является видом-основателем большинства лабораторных линий, в том числе наиболее широко используемой линии C57BL/6. Инбредная линия MSM/Ms мышей была выведена с использованием другого подвида дикой мыши, обитающей в Японии — *M. m. molossinus* (Moriwaki et al., 2009). Также из этого подвида была получена линия MOLF/Ei. Подвиды *M. m. domesticus* и *M. m. molossinus* разделяет около 1 млн лет эволюции; за такой длительный период они накопили значительное число генетических отличий — в среднем, эти подвиды, а также выведенные из них линии, содержат замены через каждые 100–200 нуклеотидов (Conner et al., 2009). Высокая частота полиморфизмов проявляется в большом количестве фенотипических различий. В том числе, было обнаружено, что такие “дикие” линии отличаются от “классических” по многим характеристикам иммунного ответа на патогенные микроорганизмы и поэтому могут быть использованы для поиска соответствующих генов с применением “прямого” генетического подхода.

Далее приведены несколько примеров использования как “классических” инбредных линий мышей, несущих спонтанные мутации в генах иммунного ответа, так и линий “диких” мышей для изучения молекулярно-генетических основ развития септического шока.

В 1968 г. для классической инбредной линии C3H были обнаружены две сублинии — ЛПС-резистентных мышей C3H/HeJ и ЛПС-чувствительных C3H/HeN (Sultzzer, 1968). Как было установлено позже, разделение на эти две линии произошло в результате спонтанной мутации в единственном гене, кодирующем рецептор ЛПС. Клонирование и секвенирование данного гена позволило идентифицировать его как TLR4, а также выявить мутацию, определяющую невосприимчивость к ЛПС: замена Pro714His в цитоплазматическом домене рецептора препятствовала его правильной димеризации, активации и передаче сигнала (Poltorak et al., 1998; Xu et al., 2000). В 1978 г. была охарактеризована другая сублиния ЛПС-резистентных мышей C57BL10/ScCR (Coutinho et al., 1978). Особи этой линии также не имеют функционального TLR4, но не из-за точечной мутации, а в результате делеции в ЛПС-локусе (Poltorak et al., 2000). Следует отметить, что линии мышей, резистентные к ЛПС- или ФНО $\alpha$ -индуцированному септическому шоку, как правило, чрезвычайно чувствительны к бактериальному заражению, что указывает на важную роль ЛПС-/ФНО $\alpha$ -зависимых реакций в элиминировании патогена (O'Brien et al., 1980).

Работа (Staelens et al., 2002) является примером использования в генетическом анализе линии “диких” мышей SPRET/Ei, выведенных из вида

*Mus spretus*, дивергировавшего с *Mus musculus* около 3 млн лет назад, с целью изучения механизма летального действия ФНО $\alpha$  при развитии септического шока. Эта линия проявляет высокую степень резистентности к ФНО $\alpha$ , в сравнении с C57BL/6 (разница составляет не менее 1 lg-единицы). В частности, у SPRET/Ei мышей инъекция препарата ФНО $\alpha$  не приводит к гипотермии, повышению уровня ИЛ-6 или активности трансаминаз в сыворотке, отслоению кишечного эпителия. С помощью интеркросса (C57BL/6  $\times$  SPRET/Ei) и серии возвратных скрещиваний к одной из родительских линий было установлено, что в формировании ФНО $\alpha$ -резистентности участвуют 2, 6 и 11 хромосомы.

Линия MOLF/Ei мышей (“дикого типа”), выведенная из *M. m. molossinus*, была успешно использована при изучении временной регуляции MyD88-/NF $\kappa$ B-зависимого сигнального пути при активации TLR (Conner et al., 2009). Макрофаги этой мышью линии отвечают на стимуляцию TLR более высоким уровнем экспрессии про-воспалительного цитокина ИЛ-6 и более высокой активностью ИКК-киназы и p38, чем макрофаги C57BL/6. Процедура генетического картирования данного признака привела к обнаружению изоформ MyD88-ассоциированной киназы IRAK-2 и гена ее ингибитора в качестве новых компонентов MyD88-каскада (Conner et al., 2009). Показано также, что макрофаги мышей линии MOLF/Ei, в отличие от клеток мышей линии C57BL/6, MSM, CZECH, SPRETUS и CAST, демонстрируют слабый иммунный ответ на активацию TLR9 олигонуклеотидами, содержащими CpG мотивы и имитирующими бактериальную ДНК (Moseman et al., 2013). Молекулярно-генетические причины данного фенотипа до конца не установлены, так как большинство компонентов сигнального каскада являются функционально активными у всех перечисленных мышью линий и фенотипические различия, вероятно, вызваны особенностями регуляции TLR9-пути.

Линия MSM/Ms мышей также является примером высокоустойчивой линии в модели ФНО $\alpha$ -/ЛПС-индуцированного септического шока. Доза ЛПС, являющаяся летальной для C57BL/6 мышей, не вызывает появления каких-либо признаков системного воспаления у MSM мышей. Включение в состав ЛПС-/ФНО $\alpha$ -инъекции D-галактозамина — блокатора синтетической функции печени — также не снижает выживаемость MSM. Резистентность к ЛПС-индуцированному септическому шоку у MSM мышей не связана с нарушением TLR4-зависимого пути, так как MSM-макрофаги секретируют высокое количество ФНО $\alpha$  при стимуляции. Следовательно, ЛПС-резистентность MSM обусловлена резистентностью на уровне восприятия ФНО $\alpha$ -сигнала. Этот тезис подтверждается тем, что инъ-

екция препарата рекомбинантного ФНО $\alpha$  в дозе, приводящей к 100%-ной гибели особей C57BL/6, абсолютно переносится MSM-особями. Предварительные данные, полученные в Лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета под руководством профессора А.Н. Полторака (ПетрГУ), показывают, что наблюдаемая у MSM мышей ФНО $\alpha$ -устойчивость не связана с нарушением рецепции ФНО $\alpha$ . Вероятно, особенности фенотипа MSM мышей связаны с регуляцией “переключения” ФНО $\alpha$ -сигнала между некроптозом/апоптозом/выживанием и воспалением (неопубликованные данные). Косвенным подтверждением данного предположения может служить работа (Nakanishi et al., 2007), в которой показано, что четырехдневный прием декстран-сульфата с питьевой водой вызывает у C57BL/6 мышей тяжелые поражения кишечника воспалительного характера, в то время как у MSM отсутствуют какие-либо признаки некроза энтероцитов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляторные механизмы, контролирующие функционирование ФНО $\alpha$  *in vivo* в норме и при патологии, в значительной степени остаются непонятны, несмотря на большой объем исследований. Вопрос о молекулярно-генетических основах высокой чувствительности/ резистентности различных типов клеток к действию ФНО $\alpha$  по-прежнему является нерешенным. Большая часть исследований по изучению механизма “переключения” между апоптозом, некрозом и выживанием при активации ФНО $\alpha$ -рецептора проведена на основе модельных клеточных линий (например, мышинных эмбриональных фибробластов, MEFs, или мышинной фибросаркомы L929) и с помощью методов “обратной” генетики (генного нокаута, нокдауна и т.п.). Однако данные экспериментальные системы имеют ограниченный потенциал, поскольку далеко не всегда позволяют понять функционирование регуляторного механизма в естественных условиях и на уровне целого организма. В связи с этим, *in vivo* модели септического шока, различающиеся по фенотипическим характеристикам развития данного процесса, представляют особую ценность.

Очевидно, что неспособность в полной мере объяснить триггерный механизм проведения ФНО $\alpha$ -зависимого сигнала связана с тем, что не все компоненты сигнального каскада идентифицированы на данный момент, либо установлены не все функции уже известных компонентов. Например, как было сказано выше, многие участники ФНО $\alpha$ -индуцируемого сигнального пути, кроме своей основной (каталитической) функции, играют роль “молекулярных платформ”, участвуют в создании необходимого микроокружения. Наиболее перспективными для решения

данной задачи представляются мышинные модели естественной, генетически обусловленной резистентности к септическому шоку.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Правительства РФ (Постановление 220, № 11.G34.31.0052) и гранта РФФИ-комфи (№ НК 13-04-40267-Н/13).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Полторака А.Н. Механизмы врожденного иммунитета. Изучение с использованием мышинной модели // Ученые записки ПетрГУ, сер. естеств. и технич. науки. 2012. № 4(125). С. 39–46.
- Brikos C., O'Neill L.A. Signalling of toll-like receptors // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008. № 183. P. 21–50.
- Brogli P., Matsumoto K., Akira S. et al. Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) kinase adaptor, TAK1-binding protein 2, plays dual roles in TAK1 signaling by recruiting both an activator and an inhibitor of TAK1 kinase in tumor necrosis factor signaling pathway // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 4. P. 2333–2339.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. № 9. P. 3666–3670.
- Cho S.Y., Choi J.H. Biomarkers of Sepsis // *Infect. Chemother.* 2014. V. 46. № 1. P. 1–12.
- Christofferson D.E., Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2010. V. 22. № 2. P. 263–268.
- Conner J.R., Smirnova I.I., Poltorak A. A mutation in Irak2c identifies IRAK-2 as a central component of the TLR regulatory network of wild-derived mice // *J. Exp. Med.* 2009. V. 206. № 7. P. 1615–1631.
- Coutinho A., Meo T. Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice // *Immunogenetics.* 1978. V. 7. № 1. P. 17–24.
- Dondelinger Y., Aguilera M.A., Goossens V. et al. RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition // *Cell. Death. Differ.* 2013. V. 20. № 10. P. 1381–1392.
- Duprez L., Takahashi N., Van Hauwermeiren F. et al. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome // *Immunity.* 2011. V. 35. № 6. P. 908–918.
- Emmerich C.H., Schmukle A.C., Walczak H. The emerging role of linear ubiquitination in cell signaling // *Sci. Signal.* 2011. V. 4. № 204. P. re5. doi: 10.1126/scisignal.2002187.
- Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis // *Cell. Res.* 2011. V. 21. № 10. P. 1383–1385.
- Giampietri C., Starace D., Petrungaro S. et al. Necroptosis: molecular signalling and translational implications // *Int. J. Cell. Biol.* 2014. V. 2014. ID 490275.
- He S., Wang L., Miao L. et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha // *Cell.* 2009. V. 137. № 6. P. 1100–1111.

- Hymowitz S.G., Wertz I.E.* A20: from ubiquitin editing to tumour suppression // *Nat. Rev. Cancer.* 2010. V. 10. № 5. P. 332–341.
- Kaczmarek A., Vandenabeele P., Krysko D.V.* Necroptosis: The release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance // *Immunity.* 2013. V. 38. № 2. P. 209–223.
- Kaiser W.J., Upton J.W., Long A.B. et al.* RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice // *Nature.* 2011. V. 471. № 7338. P. 368–372.
- King E.G., Bauzá G.J., Mella J.R. et al.* Pathophysiologic mechanisms in septic shock // *Lab. Invest.* 2014. V. 94. № 1. P. 4–12.
- Kumar A.* An alternate pathophysiologic paradigm of sepsis and septic shock: implications for optimizing antimicrobial therapy // *Virulence.* 2014. V. 5. № 1. P. 80–97.
- Lavrik I.N., Krammer P.H.* Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC // *Cell Death Differ.* 2012. V. 19. № 1. P. 36–41.
- Linkermann A., Bräsen J.H., De Zen F. et al.* Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced shock // *Mol. Med.* 2012. V. 18. P. 577–586.
- Linkermann A., Green D.R.* Necroptosis // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 370. № 5. P. 455–465.
- Marshall J.C.* Why have clinical trials in sepsis failed? // *Trends Mol. Med.* 2014. V. 20. № 4. P. 195–203.
- Mestas J., Hughes C.C.* Of mice and not men: differences between mouse and human immunology // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 5. P. 2731–2738.
- Moquin D.M., McQuade T., Chan F.K.* CYLD deubiquitinates RIP1 in the TNF $\alpha$ -induced necrosome to facilitate kinase activation and programmed necrosis // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e76841. doi: 10.1371/journal.pone.0076841.
- Moriwaki K., Miyashita N., Mita A. et al.* Unique inbred strain MSM/Ms established from the Japanese wild mouse // *Exp. Anim.* 2009. V. 58. № 2. P. 123–134.
- Moriwaki K., Chan F.K.* RIP3: a molecular switch for necrosis and inflammation // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 15. P. 1640–1649.
- Morioka S., Broglie P., Omori E. et al.* TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis following TNF stimulation // *J. Cell. Biol.* 2014. V. 204. № 4. P. 607–623.
- Moseman A.P., Moseman E.A., Schworer S. et al.* Mannose receptor 1 mediates cellular uptake and endosomal delivery of CpG-motif containing oligodeoxynucleotides // *J. Immunol.* 2013. V. 191. № 11. P. 5615–5624.
- Moujalled D.M., Cook W.D., Okamoto T. et al.* TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1 // *Cell. Death. Dis.* 2013. V. 4. P. e465. doi: 10.1038/cddis.2012.201.
- Nakanishi M., Tazawa H., Tsuchiya N. et al.* Mouse strain differences in inflammatory responses of colonic mucosa induced by dextran sulfate sodium cause differential susceptibility to PhIP-induced large bowel carcinogenesis // *Cancer. Sci.* 2007. V. 98. № 8. P. 1157–1163.
- Narayan N., Lee I.H., Borenstein R. et al.* The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis // *Nature.* 2012. V. 492. № 7428. P. 199–204.
- Naudé P.J., den Boer J.A., Luiten P.G., et al.* Tumor necrosis factor receptor cross-talk // *FEBS. J.* 2011. V. 278. № 6. P. 888–898.
- Newton K., Hildebrand J.M., Shen Z. et al.* Is SIRT2 required for necroptosis? // *Nature.* 2014. V. 506. № 7489. P. E4–6.
- O'Brien A.D., Rosenstreich D.L., Scher I. et al.* Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene // *J. Immunol.* 1980. V. 124. № 1. P. 20–24.
- Peter M.E.* Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis // *Nature.* 2011. V. 471. № 7338. P. 310–312.
- Poltorak A., He X., Smirnova I. et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene // *Science.* 1998. V. 282. № 5396. P. 2085–2088.
- Poltorak A., Smirnova I., Clisch R. et al.* Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice // *J. Endotoxin. Res.* 2000. V. 6. № 1. P. 51–56.
- Remijne Q., Goossens V., Grootjans S. et al.* Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis // *Cell. Death. Dis.* 2014. V. 5. P. e1004. doi: 10.1038/cddis.2013.531.
- Rossi D., Gaidano G.* Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease // *Haematologica.* 2003. V. 88. № 2. P. 212–218.
- Schenten D., Medzhitov R.* The control of adaptive immune responses by the innate immune system // *Adv. Immunol.* 2011. V. 109. P. 87–124.
- Schütze S., Tchikov V., Schneider-Brachert W.* Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 9. № 8. P. 655–662.
- Shuh M., Bohorquez H., Loss G.E. Jr. et al.* Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury // *Ochsner. J.* 2013. V. 13. № 1. P. 119–130.
- Staelens J., Wielockx B., Puimège L. et al.* Hyporesponsiveness of SPRET/Ei mice to lethal shock induced by tumor necrosis factor and implications for a TNF-based antitumor therapy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 14. P. 9340–9345.
- Sultzter B.M.* Genetic control of leucocyte responses to endotoxin // *Nature.* 1968. V. 219. № 5160. P. 1253–1254.
- Vanlangenakker N., Bertrand M.J., Bogaert P. et al.* TNF-induced necroptosis in L929 cells is tightly regulated by multiple TNFR1 complex I and II members // *Cell. Death. Dis.* 2011. V. 2. P. e230. doi: 10.1038/cddis.2011.111.
- Vanlangenakker N., Vanden Berghe T., Vandenabeele P.* Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview // *Cell. Death. Differ.* 2012. V. 19. № 1. P. 75–86.
- Vercammen D., Beyaert R., Denecker G. et al.* Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor // *J. Exp. Med.* 1998. V. 187. № 9. P. 1477–1485.
- Warren H.S.* Editorial: Mouse models to study sepsis syndrome in humans // *J. Leukoc. Biol.* 2009. V. 86. № 2. P. 199–201.

- Welz P.S., Wullaert A., Vlantis K. et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation // *Nature*. 2011. V. 477. № 7364. P. 330–334.
- Wu W., Liu P., Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2012. V. 82. № 3. P. 249–258.
- Xu Y., Tao X., Shen B. et al. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains // *Nature*. 2000. V. 408. № 6808. P. 111–115.
- Zhang H., Zhou X., McQuade T. et al. Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes // *Nature*. 2011. V. 471. № 7338. P. 373–376.

## Septic Shock: Innate Molecular Genetic Mechanisms of the Development of Generalized Inflammation

O. V. Kurmyshkina<sup>a</sup>, A. A. Bogdanova<sup>a</sup>, T. O. Volkova<sup>a</sup>, and A. N. Poltorak<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup>*Petrozavodsk State University, pr. Lenina 33, Petrozavodsk, 185910 Russia*

<sup>b</sup>*Department of Pathology, Tufts University School of Medicine, 150 Harrison Avenue, Boston, MA 02111*

*e-mail: VolkovaTO@yandex.ru*

Received May 6, 2014; in final form, January 29, 2015

The capacity for immune surveillance and protection against genetically alien agents is a basic property of multicellular organisms, and increasing significance in realizing this capacity is assigned to mechanisms of innate immunity. The data accumulated to date show that many components of these mechanisms have a very wide spectrum of biological functions and play essential roles at different stages of ontogeny. An illustrative example is the signal system activated by tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), which is responsible for the inflammation process. Analysis of its structural organization has shown that signaling mechanisms initiating inflammation largely overlap with mechanisms of programmed cell death. This is why hypersecretion of TNF $\alpha$  may lead to systemic inflammatory reaction, or septic shock, and, hence, have a fatal outcome. Although studies on the TNF $\alpha$ -dependent mechanism have long history, many aspects of its regulation remain obscure. In particular, this concerns the nature of interspecific differences in the sensitivity of mammals to TNF $\alpha$  action and the ability of TNF $\alpha$  to activate oppositely directed cell programs depending on cell type or ambient conditions. The numerous data obtained in studies on different experimental systems need generalization and critical analysis. This review is an attempt at such an analysis. Its scope is concentrated on modern views on the divergence of TNF $\alpha$ -induced signal at the level of intracellular receptor-associated proteins. A description is given to potential “molecular triggers” responsible for switching between the main TNF $\alpha$ -dependent signaling pathways: inflammation, apoptosis, and necroptosis. The contribution of necroptosis (genetically programmed necrotic cell death) to the development of systemic inflammation and the lethal effect of TNF $\alpha$  are described. Consideration is also given to various lines of mice possessing natural resistance or sensitivity to TNF $\alpha$ , which hold much promise as models for deciphering the molecular genetic bases of the regulation of innate immune reactions and other TNF $\alpha$ -dependent processes.

**Keywords:** inflammation, tumor necrosis factor alpha, septic shock, necroptosis, mouse models, forward genetics