



УДК 577.122

## ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ БЕЛОК ХОЛОДОВОГО ШОКА YB-1 ИНДУЦИРУЕТ ТОЛЕРАНТНОСТЬ К GMDP И LPS В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ МАКРОФАГОВ МЫШИ J774<sup>1</sup>

© 2023 г. Л. Г. Алексеева\*, #, А. Г. Ламан\*\*, Е. А. Мещерякова\*, А. О. Шепеляковская\*\*, Ф. А. Бровко\*\*, В. Т. Иванов\*

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10

\*\*ФГБУН “Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 142290 Пущино, просп. Науки, 6

Поступила в редакцию 30.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 11.12.2022 г.

Белок холодового шока YB-1 участвует в регуляции множества фундаментальных биологических процессов. Ранее мы показали, что YB-1 также вовлечен в процесс распознавания мурамилпептида GMDP рецептором системы врожденного иммунитета NOD2 и способен при предварительном введении защищать мышей от гибели в модели септического шока, индуцированного бактериями *Escherichia coli*. Мы предположили, что протективное действие YB-1 может быть связано с развитием состояния толерантности (“неотвечаемости”). Возможность индукции толерантности белком YB-1 мы проверяли в модельной системе на клеточной линии макрофагов мыши J774 с участием компонентов клеточной стенки бактерий *E. coli* – иммуностимуляторов GMDP (агонист рецептора NOD2) и LPS (агонист рецептора TLR4). Изменения клеточного ответа оценивали по уровню экспрессии мРНК целевых молекул методом количественного ПЦР-анализа, совмещенного с обратной транскрипцией. При предварительной обработке клеток YB-1 наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов – IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6 – в ответ на дальнейшую стимуляцию GMDP и LPS, а также были выявлены существенные изменения в экспрессии мРНК адаптерных молекул RIP2, MyD88 и компонентов транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Полученные нами данные показывают, что YB-1 способен индуцировать толерантность к иммуностимуляторам, таким как GMDP и LPS, по всей видимости, за счет усиления продукции противовоспалительного цитокина IL-1Ra и ингибитора SOCS1. Более точная характеристика особенностей индуцированного YB-1 состояния толерантности требует дальнейших исследований.

**Ключевые слова:** врожденный иммунитет, GMDP, LPS, фактор транскрипции YB-1, толерантность

**DOI:** 10.31857/S013234232303003X, **EDN:** PDIGUQ

### ВВЕДЕНИЕ

Эволюционно консервативный белок холодового шока YB-1 обнаруживается практически во всех клеточных структурах и участвует в регуляции множества фундаментальных биологических процессов, таких как пролиферация и миграция клеток, репарация ДНК, транскрипция, синтез белка и др. [1].

Ранее мы показали, что белок YB-1 также вовлечен в процесс распознавания мурамилпептида GMDP рецептором системы врожденного иммунитета NOD2, и YB-1 выступал необходимым компонентом для развития полноценного иммунного ответа [2]. Была продемонстрирована совместная локализация белков NOD2 и YB-1 в клетке и способность YB-1 специфически взаи-

<sup>1</sup> Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: Bcl-3 – белок, кодируемый геном *BCL3* (B-cell lymphoma 3-encoded protein); B2M –  $\beta$ 2-микроглобулин; GMDP – *N*-ацетилглюкозаминил-*N*-ацетилмурамоил-аланил-D-изоглутамин; HPRT1 – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase); IL – интерлейкин; IRAK – киназа, ассоциированная с рецептором IL-1 (interleukin-1 receptor-associated kinase); LPS – липополисахарид; MDP – мурамоилдипептид; MyD88 – белок, кодируемый геном *MYD88* (myeloid differentiation primary response gene); NOD – нуклеотид-связывающий олигомеризирующий домен (nucleotide binding oligomerization domain); RIP – белок, взаимодействующий с рецептором receptor-interacting protein; SOCS – супрессор сигнала цитокинов (suppressor of cytokine signaling); TLR – Toll-подобный рецептор (Toll-like receptor); TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 335-61-77; эл. почта: luda.alekseeva@mail.ru).

модействовать как с GMDP, так и с NOD2-рецептором [2, 3]. Полученный при иммунопреципитации с использованием антител к YB-1 белковый комплекс при анализе методом иммуноблоттинга давал четкую полосу продукта с соответствующим массе NOD2 молекулярным весом, распознаваемую также анти-NOD2-антителами. В свою очередь, анти-NOD2-антитела выявляли белок с соответствующим YB-1 размером, также реагирующий с анти-YB-1-антителами. Белок YB-1 был способен в присутствии GMDP формировать комплекс с рекомбинантным фрагментом NOD2 273–1040 а.о. ( $K_d = 4 \times 10^{-8}$ ).

Стимуляция MDP клеток, стабильно экспрессирующих рецептор NOD2, приводит к увеличению синтеза фактора транскрипции YB-1 [4]. По нашим данным, в присутствии рекомбинантного белка YB-1 значительно снижается ответ лейкоцитарных моноцитов человека линии THP-1 на стимуляцию мурамилпептидом GMDP [5], что выражалось в уменьшении относительного содержания мРНК провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$ , рецепторов врожденного иммунитета NOD2 и TLR4, их адаптерных молекул RIP2, MyD88 и субъединиц p105/p50 (NF- $\kappa$ B1) и p100/p52 (NF- $\kappa$ B2) комплекса фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. В нокаутных по YB-1 клетках THP-1 при их стимуляции GMDP наблюдали повышенный по сравнению с исходными клетками уровень мРНК IL-1 $\beta$ , а также всех вышеперечисленных молекул, участвующих в активации сигнального пути фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. Мы полагаем, что фактор транскрипции YB-1 может выполнять роль негативного регулятора активности NOD2-рецептора, но более точное определение его функций и механизмов действия требует дальнейших исследований.

Для изучения вопроса, может ли белок YB-1 сам по себе без участия GMDP модулировать иммунный ответ, были проведены эксперименты в модели септического шока на мышах линии Balb/c, инфицированных летальной дозой бактерий *Escherichia coli*, подобранной таким образом, чтобы вызывать гибель 90% животных в течение пяти дней после инъекции [6]. Дополнительно мышам вводили рекомбинантный белок YB-1 в дозе 1 мкг на животное либо вместе с суспензией бактерий, либо за 12 ч перед инъекцией бактерий. Введение YB-1 одновременно с бактериями усиливало действие *E. coli*, и все мыши погибали от сепсиса в течение 3–4 дней. Напротив, предварительная инъекция рекомбинантного белка YB-1 демонстрировала значительный протективный эффект против смертельного действия *E. coli*, в этом случае 9 из 18 животных (50%) выживали в течение 30 дней после заражения.

Поскольку, как уже говорилось выше, YB-1 принимает участие в работе системы врожденно-

го иммунитета и влияет на формирование сигналов от рецепторов врожденного иммунитета, мы предположили, что его протективное действие при предварительном введении может быть связано с развитием состояния толерантности (“неотвечаемости”) системы врожденного иммунитета мышей к дальнейшей стимуляции бактериями. Важно отметить, что уровень YB-1 повышается при воспалении и очень сильно увеличен у больных с сепсисом [7].

Цель настоящей работы заключалась в проверке предположения о возможности индукции толерантности белком YB-1 в модельной системе на клеточной линии макрофагов мыши J774 с участием компонентов клеточной стенки бактерий *E. coli* – GMDP (лиганд рецептора NOD2) и LPS (лиганд рецептора TLR4).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Толерантность к компонентам клеточной стенки бактерий – базовый регуляторный механизм при бактериальной инфекции. Феномен толерантности (“неотвечаемости”), когда стимулированные лигандами для рецепторов TLR и NOD макрофаги переставали отвечать на последующую стимуляцию теми же лигандами, известен для рецепторов TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 и NOD2 [8–10]. Существует много примеров индукции перекрестной толерантности между различными семействами рецепторов врожденного иммунитета, например, предварительная обработка мурамилпептидом MDP, лигандом для NOD2, может существенно снизить продукцию провоспалительных цитокинов в культуре первичных макрофагов человека при рестимуляции их лигандами рецепторов TLR2 и TLR4 [10]. Подобно этому, предварительная (за 14 дней) инъекция мышам мурамилпептида GMDP обеспечивала протективный эффект от токсического действия LPS у 70–90% животных [11]. Толерантность, индуцированная бактериальным липопропротеином, содержащим *N*-ацил-*S*-диацилглицерилцистеин (агонист TLR2), защищала не только от последующей летальной дозы липопропротеина, но также от инфекций, вызываемых живыми грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* и грамотрицательными бактериями *Salmonella typhimurium* [12].

Состояние толерантности могут вызывать не только агонисты рецепторов врожденного иммунитета, но также провоспалительные цитокины, например, TNF- $\alpha$  [13], и “алармины”, такие как белок теплового шока с молекулярной массой 70 кДа [14] и Mrf8 [15]. Нужно отметить, что по своим иммунологическим свойствам белки теплового шока во многом схожи с белком YB-1 – они так же демонстрируют адьювантный эффект [16] и защитное действие от инфекции [17].

**Таблица 1.** Синтетические олигонуклеотиды, используемые для амплификации целевых молекул кДНК

Мишень	Прямой праймер (5'–3')	Обратный праймер (5'–3')
<i>HPRT1</i>	CCTGCTGGATTACATCAAAGCACTG	TCCAACACTTCGTGGGGTCCT
<i>B2M</i>	ATGAGTATGCCTGCCGTGTG	CCAAATGCGGCATCTTCAAAC
<i>IL1<math>\beta</math></i>	ACAGTGGAATGAGGATG	TGTAGTGGTGGTCGGAGA
<i>TNF</i>	ATGAGCACTGAAAGCATGATC	TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC
<i>IL6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	CTCTGAAGGACTCTGGCTTTG
<i>NOD2</i>	CAATGTCACCCACAGAGTTGTAGTCC	GGCACCTCAAGTTGACATTTTGC
<i>RIP2</i>	CCATTGAGATTTTCGCATCCT	ATGCGCCACTTTGATAAACC
<i>MYD88</i>	TTGAGGAGGATTGCCAAAAG	GGGGTCATCAAGTGTGGTG
<i>IRAK4</i>	GGTCCAGATTGAGCTGTTTGCC	GTTTGTGCCACTGTTGCCGCTT
<i>p105/p50</i>	CAGCAGATGGCCATACCTT	TTGCAGATTTTGACCTGAGGGT
<i>p100/p52</i>	ACACGTACCGACAGACAACC	TTCCTTCACTCTGTGCTGG
<i>RELA</i>	CGCTTCTCTTCAATCCGGT	GAGTCTCCATGCGCTACGG
<i>REL</i>	GAAGACTGCGACCTCAATGTGG	TCTTGTTACACGGCAGATCCTT
<i>IL10</i>	TATCCAGTTTGGTAGCATCCAT	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA
<i>IL1Ra</i>	CTGTTGGCTGGCCTAATCCC	GCTTTGAACAAGCACCTGCC
<i>A20</i>	TACGACACTCGGAACTGGAAT	TGACAATGATGGGTCTTCTGA
<i>IRAK3</i>	TGAGCAACGGGACGCTTT	GATTCGAACGTGCCAGGAA
<i>BCL3</i>	AGCAGTCGTCTCAGCTCCAATG	AGGCAGGTGTAGATGTTGTGGG
<i>SOCS1</i>	TGGTTGTAGCAGCTTGTGTCTTGG	CCTGGTTTGTGCAAAGATACTGGG
<i>SOCS3</i>	ATTCACCCAGGTGGCTACAG	GCCAATGTCTTCCCAGTGT

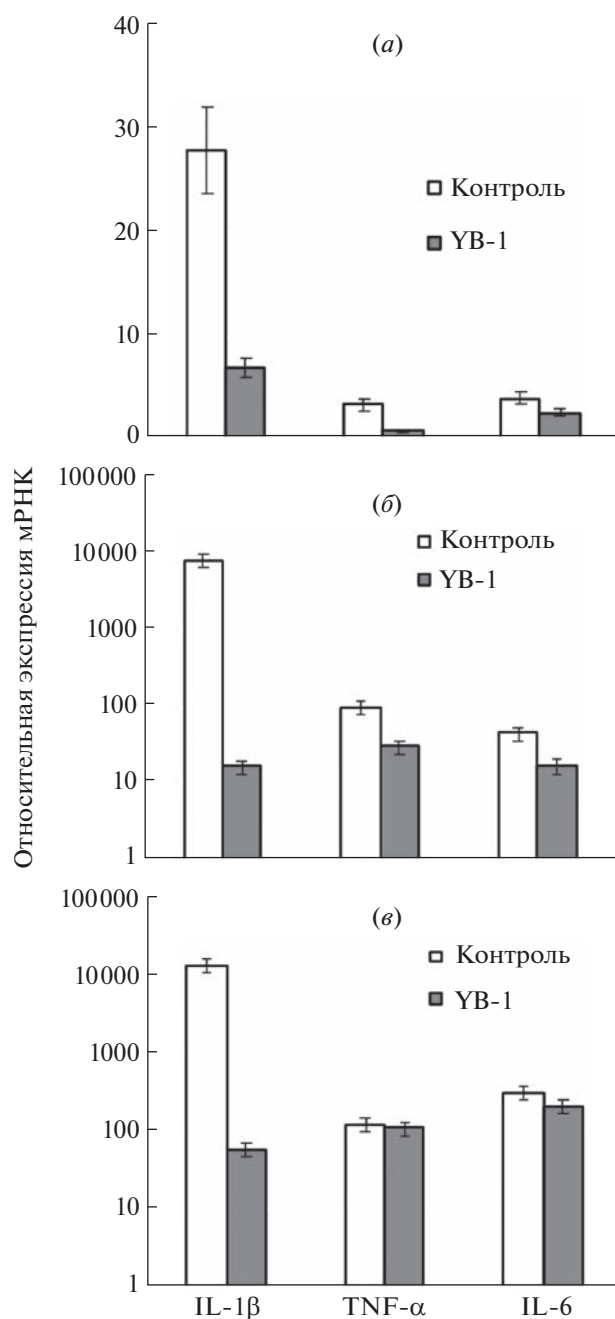
Защитный эффект, обеспечиваемый через механизм индукции толерантности, связан с перепрограммированием фагоцитирующих клеток врожденного иммунитета, выражающемся в снижении ими продукции провоспалительных цитокинов и одновременном усилении их антимикробной активности. В целом при стимуляции рецепторов врожденного иммунитета наряду с их активацией включаются механизмы обратной регуляции иммунного ответа, такие как продукция противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- $\beta$ , а также синтез и активация ингибиторных молекул в системе сигнальных путей рецепторов врожденного иммунитета, что и обеспечивает в дальнейшем реализацию состояния “неотвечаемости” клеток. При этом в зависимости от индуктора и задействованного молекулярного сигнального пути, запускающего программу толерантности, клетки могут иметь различные характеристики и параметры данного иммунологического состояния [18].

Работа выполнена на клеточной линии макрофагов мыши J774, в качестве иммуностимуляторов были использованы компоненты бактериальной клеточной стенки – мурамилпептид GMDP (агонист NOD2) и LPS (агонист TLR4). Клетки J774 предварительно инкубировали в присутствии рекомбинантного белка YB-1 в концентрации 1 мкг/мл в течение 4 ч, затем к клеткам добавляли на 2 ч либо GMDP в концентрации

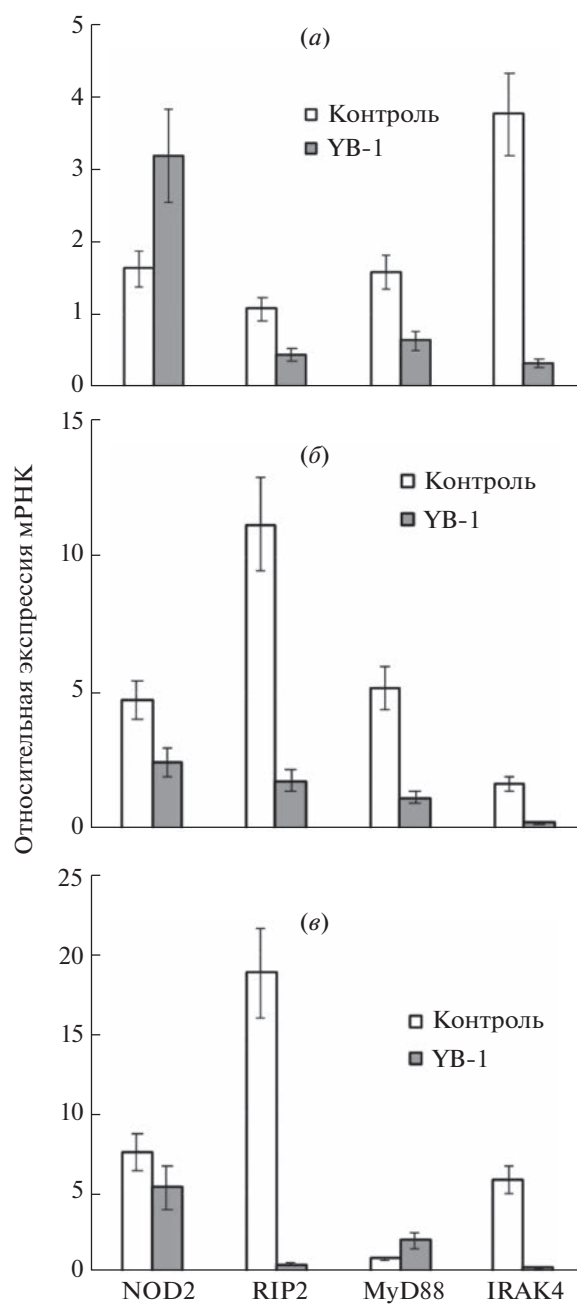
10 мкг/мл, либо LPS в концентрации 0.1 мкг/мл, либо смесь данных препаратов GMDP/LPS, которая, как известно, демонстрирует сильную синергичную реакцию [19]. В качестве контрольных использовали клетки без дополнительной инкубации с белком YB-1. Изменения клеточного ответа оценивали по уровню экспрессии мРНК целевых молекул методом количественного ПЦР-анализа, совмещенного с обратной транскрипцией. Специфические олигонуклеотиды, используемые для амплификации фрагментов целевых молекул, приведены в табл. 1.

На первоначальном этапе мы оценивали влияние предварительной инкубации с белком YB-1 на индуцированную GMDP, LPS и их смесью GMDP/LPS экспрессию мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6 (рис. 1). Как можно видеть из приведенных на рис. 1 результатов, под действием YB-1 значительно сокращался синтез мРНК всех анализируемых цитокинов, единственным исключением была почти неизменявшаяся продукция TNF- $\alpha$  при стимуляции смесью GMDP/LPS.

Далее нам представлялось интересным оценить влияние YB-1 на продукцию ряда молекул, связанных с сигнальными путями рецепторов врожденного иммунитета NOD2 и TLR4. В данной работе мы анализировали уровень экспрессии собственно NOD2, адаптерных молекул рецепторов врожденного иммунитета RIP2 и



**Рис. 1.** Относительные уровни экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и IL-6 в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (а), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

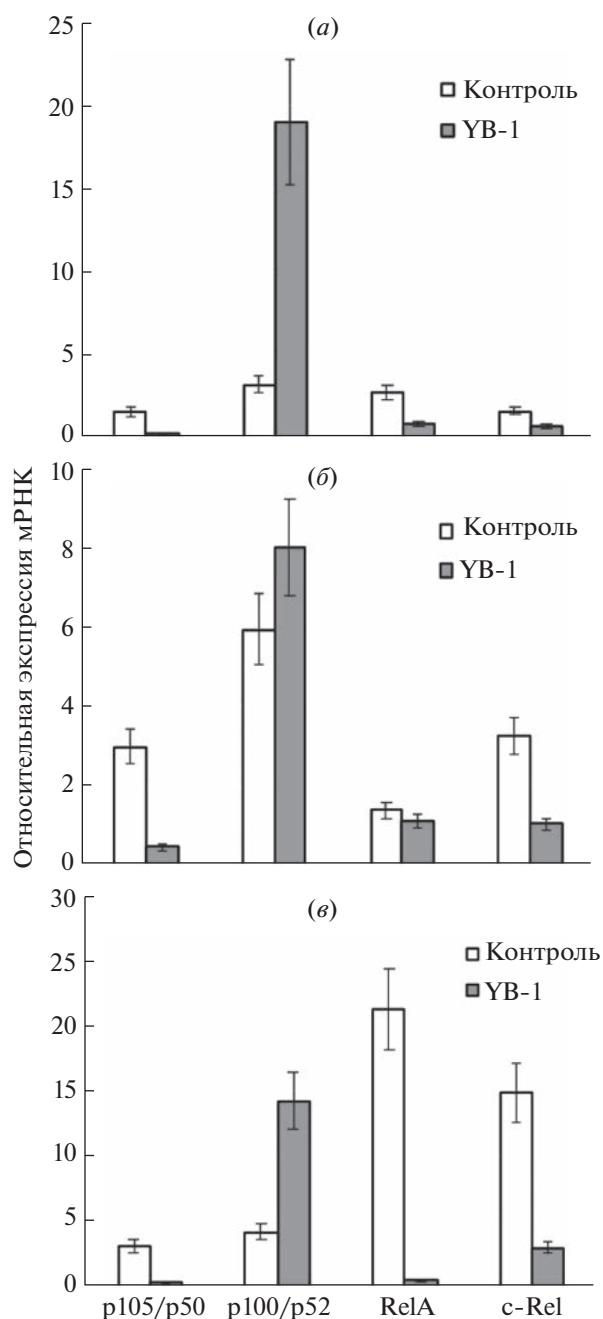


**Рис. 2.** Относительные уровни экспрессии мРНК рецептора NOD2, адаптерных молекул RIP2 и MyD88, а также киназы IRAK4 в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (а), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

MyD88, IRAK4 (interleukin-1 receptor-associated kinase) (рис. 2) и субъединиц p105/p50 (NF- $\kappa$ B1), p100/p52 (NF- $\kappa$ B2), RelA и c-Rel транскрипционного комплекса NF- $\kappa$ B (рис. 3). Как показывают наши результаты, в присутствии YB-1 существенно менялся уровень экспрессии всех проанализированных молекул. В подавляющем большинстве случаев наблюдалось снижение синтеза их мРНК, что

действительно свидетельствует об угнетении активации иммунного ответа. Усиление экспрессии можно было видеть только для NOD2-рецептора при стимуляции GMDP и для субъединицы p100/p52 транскрипционного комплекса NF- $\kappa$ B.

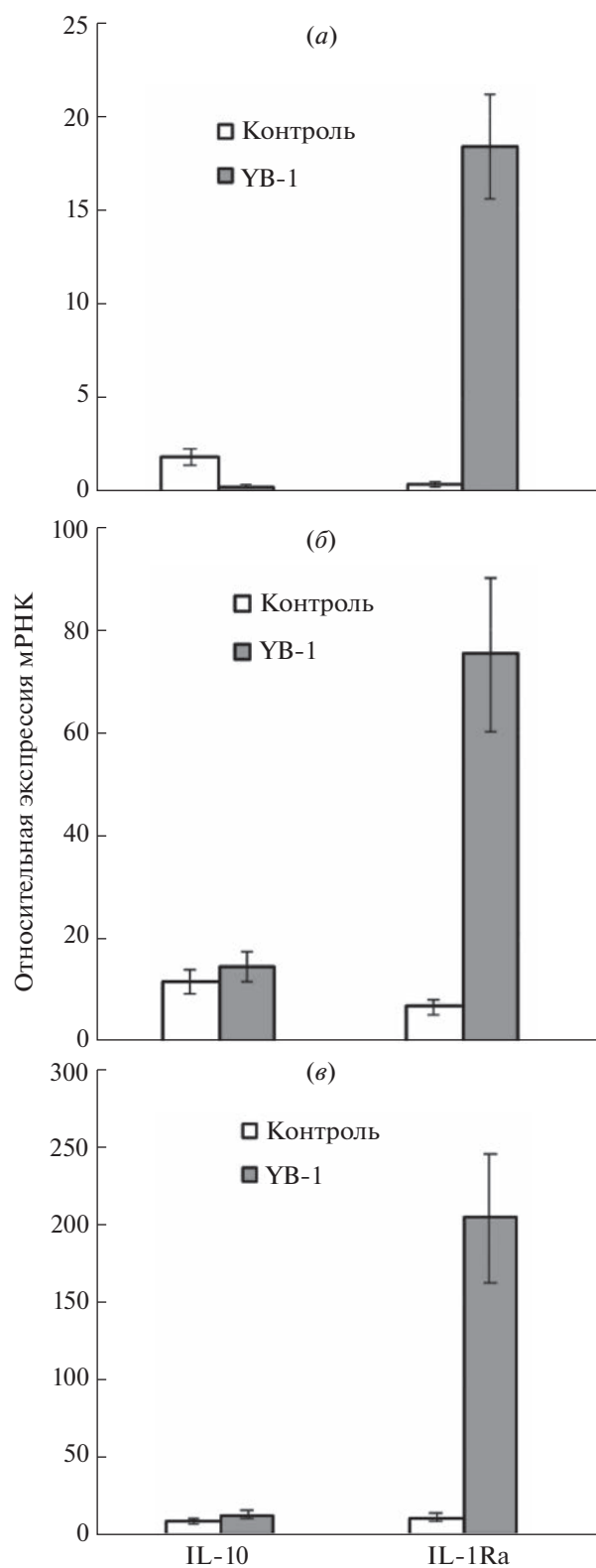
Далее для характеристики механизмов, ответственных за развитие состояния толерантности, мы проанализировали продукцию мРНК проти-



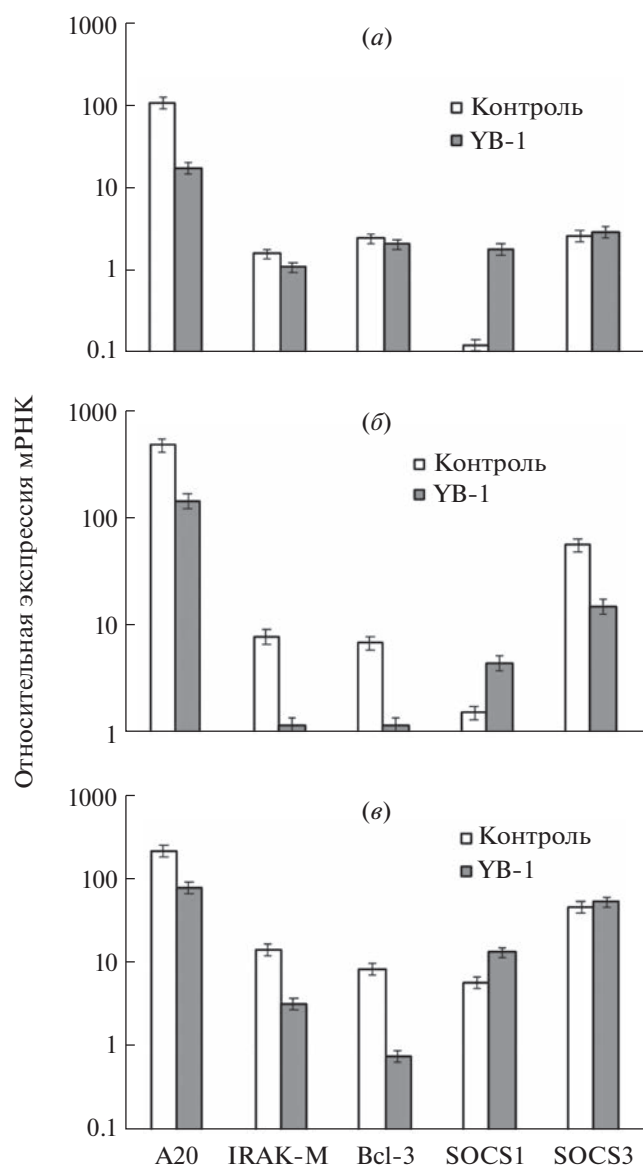
**Рис. 3.** Относительные уровни экспрессии мРНК субъединиц p105/p50, p100/p52, RelA и c-Rel фактора транскрипции NF-κB в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

вовоспалительных цитокинов IL-10, которая оставалась практически неизменной, хотя сам по себе YB-1 стимулирует синтез IL-10 [20], и IL-1Ra, уровень которой значительно возрастал при рестимуляции клеток GMDP, LPS и GMDP/LPS (рис. 4).

Как уже говорилось выше, состояние “неответственности” клеток связано с активностью ингиби-



**Рис. 4.** Относительные уровни экспрессии мРНК противовоспалительных цитокинов IL-10 и IL-1Ra в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).



**Рис. 5.** Относительные уровни экспрессии мРНК ингибиторов в сигнальных путях рецепторов врожденного иммунитета A20, IRAK-M, Bcl-3, SOCS1 и SOCS3 в клетках мышей линии J774, предварительно инкубированных с белком YB-1 и стимулированных GMDP (a), LPS (б) и GMDP/LPS (в).

торных молекул клеточных сигнальных путей от рецепторов врожденного иммунитета. В данной работе мы определяли изменение экспрессии мРНК ингибиторов A20, IRAK-M, Bcl-3, SOCS1 и SOCS3, ассоциированных с развитием толерантности под действием MDP и LPS [10, 21, 22] (рис. 5). Мы обнаружили, что предварительная инкубация с YB-1 повышала только уровень мРНК ингибитора SOCS1.

В целом полученные нами результаты показывают, что фактор транскрипции YB-1 участвует в процессе формирования сигнала от рецепторов

врожденного иммунитета и способен индуцировать толерантность к иммуностимуляторам, таким как GMDP и LPS, по крайней мере частично, за счет усиления продукции IL-1Ra и SOCS1. Более точная характеристика особенностей индуцированного YB-1 иммунного ответа требует дальнейшего изучения.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** В работе использовали GMDP (ЗАО "Пептек", Россия) и LPS (*E. coli* serotype 055:B5; Sigma, США); рекомбинантный белок YB-1 был экспрессирован в *E. coli* и очищен, как описано ранее [23].

**Клетки.** Работа выполнена на клеточной линии макрофагов мыши J774, полученной из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной фетальной сыворотки, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Для проведения эксперимента клетки вносили в лунки 6-луночного планшета в концентрации  $3 \times 10^6$  клеток в 3 мл среды на лунку. К клеткам добавляли YB-1 в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали клетки в течение 4 ч, далее к клеткам добавляли GMDP в концентрации 10 мкг/мл и/или LPS в концентрации 0.1 мкг/мл и выдерживали еще в течение 2 ч.

**ПЦР.** Выделение тотальной РНК из клеток J774 проводили реагентом TRIzol® (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя.

Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием фермента Mint (Евроген, Россия) и поли(Т)-праймаера по стандартному протоколу фирмы-производителя.

ПЦР проводили в термоциклере CX96 (Bio-Rad, США). Реакционная смесь объемом 12.5 мкл содержала 1 мкг кДНК, 2.5 мкл готовой 5× реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), в которую входят Taq ДНК-полимераза со специфическими моноклональными антителами, краситель SYBR Green I, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, MgCl<sub>2</sub>, ПЦР-буфер, и по 10 пМ каждого из двух специфических олигонуклеотидов (последовательности олигонуклеотидов приведены в табл. 1).

Протокол амплификации включал следующие этапы: 1 цикл 94°C – 4 мин (денатурация); 40 циклов: 94°C – 20 с (денатурация цепей ДНК), 60°C – 20 с (отжиг праймеров с матрицей), 72°C – 40 с (синтез комплементарных цепей ДНК); 1 цикл 72°C – 3 мин (завершающий синтез).

Относительный уровень мРНК целевых генов рассчитывали по методу  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [24]. Относительную концентрацию субстрата нормализовали по

усредненным данным амплификации двух эндогенных генов сравнения — *HPRT1* и *B2M*:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}})_{\text{exp}} - (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}})_{\text{contr}}$$

где  $CT$  — количество циклов, требуемых для достижения порогового значения флуоресценции. Относительный уровень мРНК вычисляли как  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Все реакции проводили в трех повторностях и включали отрицательный контроль без обратной транскриптазы. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые предпринята попытка охарактеризовать иммунологические механизмы, ответственные за индукцию состояния толерантности белком холодного шока  $\gamma B-1$  в макрофагальных клетках мышцы. Полученные нами результаты показывают, что фактор транскрипции  $\gamma B-1$  участвует в процессе формирования сигнала от рецепторов врожденного иммунитета и способен индуцировать толерантность к иммуностимуляторам, таким как GMDP и LPS, по крайней мере частично, за счет усиления продукции противовоспалительного цитокина IL-1Ra и ингибитора SOCS1. Более точная характеристика особенностей индуцированного  $\gamma B-1$  состояния толерантности ответа требует дальнейшего изучения.

Знание точных молекулярных механизмов функционирования системы врожденного иммунитета будет способствовать созданию вакцин нового поколения, развитию терапевтических подходов к лечению иммунодефицитных состояний и в случаях “чрезмерного” воспаления при аутоиммунных заболеваниях и сепсисе.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-01152а).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindquist J.A., Mertens P.R. // Cell Commun. Signal. 2018. V. 16. P. 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0274-6>
2. Laman A.G., Lathe R., Shepelyakovskaya A.O., Gartseva A., Brovko F.A., Guryanova S.V., Alekseeva L.G., Meshcheryakova E.A., Ivanov V.T. // Innate Immun. 2016. V. 22. P. 666–673. <https://doi.org/10.1177/1753425916668982>
3. Laman A.G., Lathe R., Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Baidakova L.K., Chulin A.N., Brovko F.A., Svirshchevskaya E.V., Kotelevtsev Y., Eliseeva I.A., Guryanov S.G., Lyabin D.N., Ovchinnikov L.P., Ivanov V.T. // FEBS Lett. 2015. V. 589. P. 1819–1824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.028>
4. Weichart D., Gobom J., Klopffleisch S., Häsler R., Gustavsson N., Billmann S., Lehrach H., Seeger D., Schreiber S., Rosenstiel P. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 2380–2389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505986200>
5. Алексеева Л.Г., Ламан А.Г., Шепеляковская А.О., Плеханова Н.С., Иванов В.Т. // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. С. 404–411. [Alekseeva L.G., Plekhanova N.S., Ivanov V.T., Laman A.G., Shepelyakovskaya A.O. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V. 45. P. 285–291.] <https://doi.org/10.1134/S1068162019040022>
6. Shepelyakovskaya A.O., Alekseeva L.G., Meshcheryakova E.A., Boziev Kh., Tsirina A., Ivanov V.T., Brovko F.A., Kotelevtsev Y., Lathe R., Laman A.G. // bioRxiv preprint. 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.11.09.515841>
7. Hayden M.S., Ghosh S. // Cell. 2008. V. 132. P. 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
8. Nomura F., Akashi S., Sakao Y., Sato S., Kawai T., Matsumoto M., Nakanishi K., Kimoto M., Miyake K., Takeda K., Akira S. // J. Immunol. 2000. V. 164. P. 3476–3479. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3476>
9. Mizel S.B., Snipes J.A. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 22414–22420. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201762200>
10. Hedl M., Li J., Cho J.H., Abraham C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 19440–19445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706097104>
11. Meshcheryakova E., Guryanova S., Makarov E., Alekseeva L., Andronova T., Ivanov V. // Int. Immunopharmacol. 2001. V. 9–10. P. 1857–1865. [https://doi.org/10.1016/s1567-5769\(01\)00111-4](https://doi.org/10.1016/s1567-5769(01)00111-4)
12. O'Brien G.C., Wang J.H., Redmond H.P. // J. Immunol. 2005. V. 174. P. 1020–1026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.1020>
13. Huber R., Bikker R., Welz B., Christmann M., Brand K. // J. Immunol. Res. 2017. P. 9570129. <https://doi.org/10.1155/2017/9570129>
14. Aneja R., Odoms K., Dunsmore K., Shanley T.P., Wong H.R. // J. Immunol. 2006. V. 177. P. 7184–7192. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7184>
15. Coveney A.P., Wang W., Kelly J., Liu J.H., Blankson S., Wu Q.D., Redmond H.P., Wang J.H. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13694. <https://doi.org/10.1038/srep13694>

16. *Bolhassani A., Rafati S.* // *Exp. Rev. Vaccines*. 2008. V. 8. P. 1185–1199. <https://doi.org/10.1586/14760584.7.8.1185>
17. *Hsu J.H., Yang R.C., Lin S.J., Liou S.F., Dai Z.K., Yeh J.L., Wu J.R.* // *Shock*. 2014. V. 42. P. 540–547. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000254>
18. *Butcher S.K., O'Carroll C.E., Wells C.A., Carmody R.J.* // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. P. 933. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00933>
19. *Fritz J.H., Girardin S.E., Fitting C., Werts C., Mengin-Lecreulx D., Caroff M., Cavallion J.M., Philpott D.J., Adib-Conquy M.* // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. P. 2459–2470. <https://doi.org/10.1002/eji.200526286>
20. *Wang J., Djudjaj S., Gibbert L., Lennartz V., Breitkopf D.M., Rauen T., Hermert D., Martin I.V., Boor P., Braun G.S., Floege J., Ostendorf T., Raffetseder U.* // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. V. 12. P. 3494–3505. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13260>
21. *Hu J., Wang G., Liu X., Zhou L., Jiang M., Yang L.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. e87528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087528>
22. *Xiong Y., Medvedev A.E.* // *J. Leukoc. Biol.* 2011. V. 90. P. 1141–1148. <https://doi.org/10.1189/jlb.0611273>
23. *Savinov G.V., Shepelyakovskaya A.O., Boziev Kh.M., Brovko F.A., Laman A.G.* // *Biochemistry (Moscow)*. 2014. V. 79. P. 131–138. <https://doi.org/10.1134/S0006297914020060>
24. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

## Extracellular Cold Shock Protein YB-1 Induces Tolerance to GMDP and LPS in Mouse Macrophage Cell Line J774

L. G. Alekseeva<sup>\*, #</sup>, A. G. Laman<sup>\*\*</sup>, E. A. Meshcherykova<sup>\*</sup>, A. O. Shepelyakovskaya<sup>\*\*</sup>, F. A. Brovko<sup>\*\*</sup>, and V. T. Ivanov<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 335-61-77; e-mail: luda.alekseeva@mail.ru

<sup>\*</sup>Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

<sup>\*\*</sup>Branch of Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, 142290 Russia

Cold shock protein YB-1 is involved in the regulation of a huge number of fundamental biological processes. Previously, we showed that YB-1 is also involved in the process of recognition of muramylpeptide GMDP by the innate immune receptor NOD2 and is able upon preliminary administration to protect mice from death in a model of septic shock induced by *Escherichia coli* bacteria. We hypothesized that its protective effect may be associated with the development of a state of tolerance (“nonresponsiveness”). Changes in the cellular response were assessed by the level of mRNA expression of the target molecules by quantitative PCR analysis combined with reverse transcription. We tested the possibility of tolerance induction by the YB-1 protein in a model system on the J774 mouse macrophage cell line with the participation of *E. coli* bacterial cell wall components, immunostimulants GMDP (NOD2 receptor agonist) and LPS (TLR4 receptor agonist). Pre-treatment of cells with YB-1 resulted in a significant decrease in the level of mRNA expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 in response to further stimulation with GMDP and LPS, as well as significant changes in the expression of mRNA of RIP2 and MyD88 adapter molecules and components of transcriptional factor NF- $\kappa$ B. Our data show that YB-1 is able to induce tolerance to such as GMDP and LPS immunostimulants, apparently by increasing the production of the anti-inflammatory cytokine IL-1Ra and the SOCS1 inhibitor. A more precise characterization of the features of the YB-1-induced tolerogenic immune response requires further research.

**Keywords:** innate immunity, GMDP, LPS, transcription factor YB-1, tolerance