

Д.С. Ожегова, М.Б. Фрейдин, И.А. Гончарова, В.П. Пузырев
**УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА
 IFNG, STAT1 И MCP1 В УСЛОВИЯХ РАЗЛИЧНОЙ
 АНТИГЕННОЙ НАГРУЗКИ**

УДК 575.191:616-002.5:616.981.49

Приведены результаты сравнения уровня экспрессии генов *IFNG*, *STAT1*, *MCP1* в культурах мононуклеарных клеток при воздействии стимуляторов различной природы: PHA (фитогемагглютинин), TDM (трехалозе 6,6'-димиколат, корд-фактор *Mycobacterium tuberculosis*), LPS (липополисахарид *Salmonella enterica* serotype enteritidis), IFN-γ (интерферон-γ), IL-4 (интерлейкин-4) и их комбинации. Показано, что TDM мало влияет на экспрессию генов иммунного ответа, но в комбинации с IFN-γ может усиливать их экспрессию. Повышение уровня экспрессии генов *IFNG*, *STAT1* и *MCP1* отмечено во всех клеточных культурах, стимулированных LPS, IL-4 и их сочетанием.

Ключевые слова: экспрессия генов, клеточные культуры, гены иммунного ответа.

In this review, we compared *IFNG*, *STAT1* and *MCP1* expression levels in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated by PHA (phytohemagglutinin), TDM (trehalose 6,6'-dimicolate, cord-factor from *Mycobacterium tuberculosis*), LPS (lipopolysaccharide from *Salmonella enterica* serotype enteritidis), IFN-γ (interferon gamma), IL-4 (interleukin 4) and their combination. It was shown that inductor TDM had insignificant influence on expression level of innate immunity genes, but the combination TDM and IFN-γ increased their expression. Increased gene expression level of *IFNG*, *STAT1*, *MCP1* expression levels were also detected in PBMC exposed with LPS, IL-4 and their combination.

Keywords: gene expression, cell cultures, innate immunity genes.

Сокращения:

ген *IFNG* (IFG, IFI) – ген интерферон гамма, MIM: 147570

ген *STAT1* (ISGF-3, *STAT91*) – ген сигнального белка – трансдуктора и активатора транскрипции, MIM: 600555

ген *MCP1* (CCL2) – ген моноцитарного хемотаксического протеина, MIM: 158105

стимулятор PHA – фитогемагглютинин
 стимулятор TDM – трехалозе 6,6'-димиколат, корд-фактор *Mycobacterium tuberculosis*

стимулятор LPS – липополисахарид *Salmonella enterica* serotype enteritidis
 стимулятор IFN-γ – интерферон-γ
 стимулятор IL-4 – интерлейкин-4

Введение

Одной из проблем современной медицины является изучение этапов возникновения и развития иммунопатологического процесса при инфицировании различного рода бактериями. Для более полного понимания механизмов формирования иммунного ответа требуется изучение функционирования генов, определяющих развитие защитных реакций при внедрении патогена. В связи с этим вызывает интерес исследование экспрессии генов регуляторных молекул, обеспечивающих критические этапы развития иммунного ответа: распознавание патогена, проведение внутриклеточного активационного сигнала, синтез цито-

кинов в условиях воздействия бактериальных компонентов на клетки иммунной системы человека [9].

Компоненты микробной клеточной стенки являются потенциальными стимуляторами экспрессии цитокинов макрофагами, моноцитами, нейтрофилами и другими клетками [3]. Но известно, что по крайней мере два компонента *M. tuberculosis* – 19-кДа липопроtein и пептидогликан клеточной стенки (содержащийся в микопарабиногалактан пептидовом комплексе) – ингибируют ответ макрофагов на IFN-γ на транскрипционном уровне. В настоящее время получены противоречивые данные относительно TDM. С одной стороны, для этого компонента микобактериальной клеточной стенки показано, что он индуцирует формирование грануломы и продукцию провоспалительных цитокинов *in vivo* и *in vitro* [9], однако, по данным Perez et al. [10], изменений в уровнях экспрессии гена *IFNG* при действии TDM не обнаружено. Поэтому одна из задач проведенного исследования состояла в изучении действия TDM и LPS на экспрессию генов иммунного ответа в культуре мононуклеарных клеток крови.

Основным активатором макрофагов, клеток, выполняющих главную защитную роль против внутриклеточных инфекций, является IFN-γ, который регулируя экспрессию более 500 генов, играет значительную интегративную роль в координации иммунного ответа на множество сигналов от разных типов клеток [4]. Дефект синтеза IFN-γ, нарушения во внутриклеточной передаче сигнала, посредством ассоциированной с IFN-γ молекулы *STAT1* (Signal transducer and activator of transcription) вызывают иммунологические дефекты, повышающие риск развития хронических бактериальных инфекций [6].

Установлено, что *M. tuberculosis* может блокировать эффекты IFN-γ путем нарушения транслокации гомодимера *STAT1* в ядро, где он инициирует экспрессию IFN-γ-индуцированных генов провоспалительных цитокинов (*TNF-α*, IL-12 и др.). Еще одним важнейшим фактором иммунитета против внутриклеточных бактерий является *MCP-1* (моноцитарный хемотаксический протеин), участвующий в дифференцировке Т-клеток, созревании моноцитов, а также в привлечении Т-хелперных клеток, NK-клеток, базофилов и моноцитов в очаг воспаления.

Учитывая эти обстоятельства, для исследования выбраны гены *IFNG*, *STAT1* и *MCP1*.

Целью исследования явилась оценка уровня экспрессии генов иммунного ответа *IFNG*, *STAT1* и *MCP1* в краткосрочных культурах мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров в условиях различной антигенной нагрузки: PHA, TDM, LPS, IFN-γ, IL-4 и их комбинации.

Материалы и методы

Материалом для исследования служила венозная кровь 98 здоровых жителей г. Томска русской национальности. Уровень экспрессии исследуемых генов в культурах периферических мононуклеарных клеток с индукторами и в не стимулированных культурах определен у 14 здоровых доноров.

Мононуклеарные клетки периферической крови выделяли путем центрифугирования гепаринизированной венозной крови при 2000 оборотов/мин в течение 30 мин. Клетки, собранные из интерфазы, помещали в культуральные матрасики со средой RPMI-1640 (в количестве 6 мл среды на 1 мл супернатанта), с 1% эмбриональной телячьей сывороткой, глутамином и

ОЖЕГОВА Диана Сергеевна – врач-биохимик, аспирант ГУ “Сибирский гос. мед. ун-т Федерального агентства по здравоохранению и соц. развитию”, diana2005_83@mail.ru; НИИ медицинской генетики СО РАМН: **ФРЕЙДИН Максим Борисович** – к.б.н., с.н.с., email: mfreidin@well.ox.ac.uk; **ГОНЧАРОВА Ирина Александровна** – к.б.н., н.с.; **ПУЗЫРЕВ Валерий Павлович** – акад. РАМН, проф., директор НИИ.

аминокислотами. Клетки инкубировали при 37°C в течение 12-16 часов. По истечении этого срока в культуры добавляли стимуляторы (Sigma): PHA (10 мкг/мл), TDM (100 нг/мл), LPS (100 нг/мл), IFN- γ (100 нг/мл), IL-4 (20 нг/мл), и их комбинации TDM+IL-4 (120 нг/мл), TDM+IFN- γ (200 нг/мл), LPS+IL-4 (120 нг/мл), LPS+IFN- γ (200 нг/мл). Для контроля использовали не стимулированные клетки. Время экспозиции клеточных культур с индукторами составило 1 ч для культур с LPS и 3 ч для остальных культур. Измерение концентрации клеток в клеточной суспензии проводили с помощью гематологического анализатора «Micros 60», фирмы ABX Diagnostics.

Выделение суммарной мРНК проводили с использованием набора TRI-Reagent (Mrcgene). Концентрацию мРНК определяли путем измерения оптической плотности на спектрофотометре Nanodrop. Стандартизацию концентрации мРНК проводили на этапе получения кДНК (10 нг/мкл). Реакцию обратной транскрипции проводили в объеме 40 мкл, с использованием обратной транскриптазы фирмы Medigen (Новосибирск). Для количественной оценки экспрессии мРНК в культуре клеток использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-PCR). Для RT-PCR использовали наборы праймеров и TaqMan-зондов фирмы Sintel (Новосибирск). Реакцию проводили в амплификаторе с оптической насадкой iCycler iQ (BIORAD Lab, USA).

Для количественного определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали сравнительный Ct метод (Applied Biosystem). Уровень экспрессии специфических генов сначала калибровали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), затем уровень экспрессии специфических генов в стимулированных клеточных культурах нормализовали относительно соответствующих показателей для не стимулированных культур (контроль). Все результаты представлены как n -кратные различия между уровнем экспрессии специфического гена в стимулированных и не стимулированных культурах.

Статистическая обработка данных проведена с расчетом среднего арифметического значения n -кратных различий между уровнем экспрессии специфического гена в стимулированных и не стимулированных культурах и ошибки среднего для каждой группы с

использованием программы STATistica for Windows 6.0. (STATSoft, USA). Статистическую значимость различий показателей уровня экспрессии между исследуемыми группами определяли с использованием непараметрического критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждения

В культурах мононуклеарных клеток человека, стимулированных PHA, TDM, LPS, IFN- γ , IL-4 и их комбинациями (TDM+IL-4, TDM+IFN- γ , LPS+IL-4, LPS+IFN- γ) изучена экспрессия генов *IFNG*, *STAT1* и *MCP1*.

При стимуляции культур мононуклеарных клеток крови микробными продуктами TDM и LPS, индукторами иммунного ответа IFN- γ и IL-4, а также комбинациями LPS+IFN- γ и TDM+IFN- γ отмечено повышение уровня экспрессии гена *IFNG* по сравнению с контролем (рис.1). Стимуляция TDM и IFN- γ приводила к повышению уровня экспрессии гена *IFNG* на 23 и 42%, соответственно, а при введении в культуру сочетания TDM+IFN- γ отмечено повышение уровня экспрессии исследуемого гена на 54% по сравнению с контролем. Уровень экспрессии гена *IFNG* при стимуляции LPS, IL-4 или сочетанием LPS+IFN- γ повышался в два и более раза по сравнению с не стимулированной культурой (рис.1). Показаны статистически значимые различия в изменении уровня экспрессии гена *IFNG* при введении TDM, IFN- γ и TDM+IFN- γ по сравнению с культурами, стимулированными LPS, IL-4 и комбинацией LPS+IFN- γ . При стимуляции LPS уровень экспрессии исследуемого гена по сравнению с контролем достигал значения $2,34 \pm 1,54$ и статистически значимо отличался от более низких значений для культур, стимулированных TDM ($1,23 \pm 1,09$, $p < 0,004$) и IFN- γ ($1,42 \pm 1,07$, $p < 0,05$). Уровень экспрессии гена *IFNG* в культурах, стимулированных IL-4, повышался в $2,42 \pm 1,46$ раза по отношению к

не стимулированной культуре, что значительно выше изменения уровня экспрессии в культуре, индуцированной TDM ($p < 0,003$), IFN- γ ($p < 0,02$) и комбинации TDM+ IFN- γ ($1,54 \pm 1,18$, $p < 0,02$). Также отмечены статистически значимые отличия ($p < 0,006$) в уровне экспрессии гена *IFNG* между культурами, индуцированными TDM ($1,23 \pm 1,09$) и комбинацией LPS+IFN- γ ($2,19 \pm 1,52$).

Таким образом, наиболее выраженное повышение экспрессии гена *IFNG* наблюдали при стимуляции бактериальным продуктом LPS, индуктором иммунного ответа IL-4 и комбинацией LPS+IFN- γ . По данным литературы [1], уровень экспрессии гена *IFNG* при стимуляции культур клеток PHA и PPD (purified protein derivative antigen, микобактериальный антиген) у здоровых людей выше по сравнению с экспрессией этого гена в не стимулированных клеточных культурах. В проведенном исследовании также отмечен повышенный уровень экспрессии гена *IFNG* в стимулированных культурах относительно спонтанного уровня. По данным Lang et al. [7], в культуре не стимулированных мононуклеарных клеток экспрессия гена *IFNG* не обнаруживалась или детектировалась очень слабо. После стимуляции LPS уровень экспрессии гена *IFNG* повышался, но не существенно. Стимуляция PHA, напротив, приводила к индукции экспрессии гена *IFNG*. В нашем исследовании, неспецифический индуктор PHA повышал уровень экспрессии гена

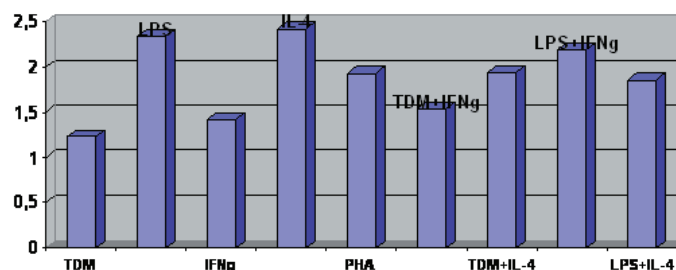


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *IFNG* при стимуляции TDM, LPS, IFNg, IL-4, PHA, TDM+IFNg, TDM+IL-4, LPS+IFNg, LPS+IL-4. В рис.1-3 за единицу принят базальный уровень экспрессии исследуемого гена при отсутствии стимуляции

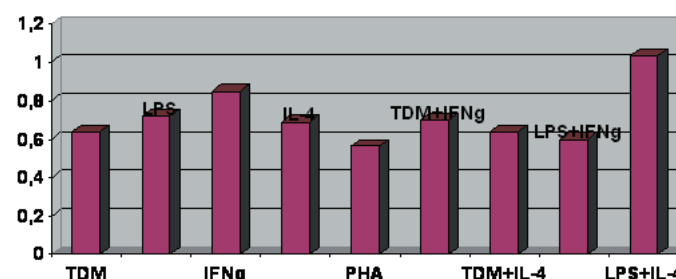


Рис. 2. Уровень экспрессии гена *STAT1* при стимуляции TDM, LPS, IFNg, IL-4, PHA, TDM+IFNg, TDM+IL-4, LPS+IFNg, LPS+IL-4

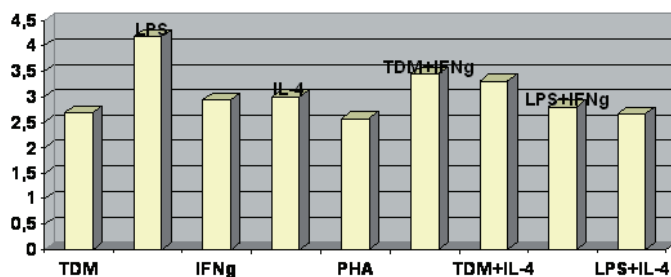


Рис. 3. Уровень экспрессии гена MCP-1 при стимуляции TDM, LPS, IFNγ, IL-4, PHA, TDM+IFNγ, TDM+IL-4, LPS+IFNγ, LPS+IL-4

IFNγ в меньшей степени, чем LPS или LPS+IFN-γ.

Активирующее действие LPS на провоспалительные цитокины, в том числе на ген *IFNG*, можно объяснить наличием ARE (adenosine-uridine-rich element) – элемента в пределах 3'-UTR мРНК, который играет значительную роль в осуществлении посттранскрипционных механизмов проведения сигнала LPS. LPS-сигнал стабилизирует мРНК, блокируя ее деградацию, что ведет к быстрому накоплению соответствующего белкового продукта [5].

При стимуляции PHA и сочетаниями TDM+IL-4 и LPS+IFN-γ отмечено снижение уровня экспрессии гена *STAT1* в среднем на 40% по сравнению с уровнем экспрессии в не стимулированной культуре (рис. 2). Воздействие на клеточную культуру комбинации LPS+IL-4 способствовало повышению уровня экспрессии гена ядерного фактора *STAT1* до значений не отличимых от уровня экспрессии контроля. Показаны статистически значимые различия в изменении уровня экспрессии исследуемого гена между культурами стимулированными PHA ($0,56 \pm 0,29$, $p < 0,02$), TDM+IL-4 ($0,64 \pm 0,47$, $p < 0,03$), LPS+IFN-γ ($0,60 \pm 0,46$, $p < 0,04$) и культурой, стимулированной комбинацией LPS+IL-4 ($1,03 \pm 0,64$). Анализ экспрессии генов с помощью микрочиповой технологии показал, что примерно 40% IFN-γ-индуцируемых генов уменьшают свою экспрессию, если клетки инфицированы живыми *M. tuberculosis* или клеточная культура обработана 19-кДа липопротеином *M. tuberculosis* [11]. Кроме того, многие IFN-γ-зависимые гены, вовлеченные в контроль развития микобактериальной инфекции, могут быть, как индуцированы, так и супрессированы совместным воздействием продуктов деятельности *M. tuberculosis* и IFN-γ. В нашей работе отмечено ингибиру-

ющее действие компонента микобактериальной стенки TDM на экспрессию гена *STAT1*.

Известно, что негативная регуляция экспрессии IFN-γ-индуцируемых генов, в том числе и *STAT1*, может быть опос-

редована супрессорами SOCS1 или SOCS3 [12]. Инкубация макрофагов с LPS индуцирует SOCS3 через Toll-like рецепторы 2 и 4. Возможно, ингибирующее действие LPS на экспрессию гена *STAT1* имеет подобный механизм.

При анализе уровней экспрессии гена *MCP1* в исследуемых группах выявлена тенденция к увеличению экспрессии в клеточных культурах, стимулированных LPS, в $4,18 \pm 2,69$ раза по сравнению с контролем (рис. 3). Кроме того, наблюдались достоверные отличия в уровнях экспрессии в культурах, стимулированных LPS, по сравнению с культурами индуцированными LPS+IL-4 ($2,67 \pm 2,57$, $p < 0,01$) и LPS+IFN-γ ($2,81 \pm 2,49$, $p < 0,04$). Стимуляция IL-4, TDM+IFN-γ и TDM+IL-4 повышала уровень экспрессии гена *MCP1* в клеточных культурах в три и более раза по сравнению с не стимулированной культурой (рис. 3). Стимулирующее влияние IL-4 на продукцию *MCP1* показано в работе по регуляции функций эндотелиальных клеток цитокинами: оценка изменения уровня секреции *MCP-1* эндотелиальными клетками E.A.hy926 под влиянием IFN-γ, IL-4, а также их комбинацией через 24 часа после отмывки от цитокинов показала, что только IL-4 оказывал стимулирующее влияние на секрецию *MCP-1* этими клетками [2]. Таким образом, LPS может быть применим для изучения экспрессии гена *MCP1*, так как из всех опробованных стимуляторов он позволял получить наибольший уровень экспрессии этого гена.

Следовательно, LPS – компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий, индуцирует экспрессию генов иммунного ответа в культурах мононуклеарных клеток крови здоровых доноров. Стимулятор TDM в меньшей степени влияет на экспрессию изучаемых генов, но в комбинации с IFN-γ

он может усиливать их экспрессию. Повышение уровня экспрессии генов *IFNG*, *STAT1* и *MCP1* наблюдалось во всех клеточных культурах стимулированных LPS, IL-4 или их сочетанием. Выявлено негативное влияние неспецифического митогена PHA и индукторов микробной природы в сочетании с цитокинами TDM+IL-4 и LPS+IFN-γ на экспрессию гена *STAT1*. Для генов *IFNG* и *MCP1* наиболее эффективным стимуляторами экспрессии являются LPS и его комбинации с IFN-γ и IL-4.

Литература

1. Пичугина Л.В., Пинегин Б.В.. Применение метода оценки экспрессии мРНК *IFNG* и комплекса методов для поэтапной оценки пути *IFNG* и его продукции у больных с микобактериальными инфекциями // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – том 7, №9. – С.159-166
2. Фрейдлин И.С., Старикова Э.А.. Регуляция функций эндотелиальных клеток цитокинами // Сборник по материалам Всероссийского симпозиума «Биология клетки в культуре». – С.808
3. Biswas R., Shyamasree D.. Regulation of Chemokine mRNA Stability by Lipopolysaccharide and IL-10 // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 170. – P.6202-6208
4. Brewington R.. IFN-γ-Independent Autocrine Cytokine Regulatory Mechanism in Reprogramming of Macrophage Responses to Bacterial Lipopolysaccharide // The Journal of Immunology. – 2001. – Vol. 167. – P.392-398
5. Grutz G.. New insight into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression // Journal of Leukocyte Biology. – 2005. – Vol. 77. – P.3-15
6. Kincaid E.. Mycobacterium tuberculosis Exerts Gene-Selective Inhibition of Transcriptional Responses to IFN-γ without Inhibiting *STAT1* Function // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 171. – P.2042-2049
7. Lang R., Heeg K.. Semiquantitative determination of human cytokine mRNA expression using TagMan RT-PCR // Inflammopharmacology. – 1998. – Vol. 6. – P.297-309
8. Lopez-Maderuelo D., Arnalich F.. Interferon-γ and Interleukin-10 Gene Polymorphisms in Pulmonary Tuberculosis // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2003. – Vol. 167. – P.970-975
9. Ottenhoff T. H. M., van Crevel R.. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, No 2. – P.294-309
10. Perez R.L., Roman J., Roser S.. Cytokine Message and Protein Expression During Lung Granuloma Formation and Resolution Induced by the Mycobacterial Cord Factor Trehalose-6,6'-Dimycolate // Journal of Interferon & Cytokine Research. – 2000. – Vol. 20, No. 9. – P.795-804
11. Schnappinger D., Ehrt S.. Expression profiling of host pathogen interactions: how mycobacterium tuberculosis and the macrophage adapt to one another // Microbes and Infection. – 2006. – Vol. 20. – P.1-9
12. Qiao Y.. Posttranscriptional Inhibition of Gene Expression by Mycobacterium tuberculosis Offsets Transcriptional Synergism with IFN-γ and Posttranscriptional Up-Regulation by IFN-γ // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 171. – P.2042-2049.