

УДК 577.218

©Коллектив авторов

**ФРАГМЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК УСИЛИВАЮТ
ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕНОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, АКТИВИРУЮТ TLR-ЗАВИСИМЫЙ
СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ И ИНГИБИРУЮТ АПОПТОЗ**

С.В. Костюк^{1}, Е.М. Малиновская¹, А.В. Ермаков¹, Т.Д. Смирнова¹,
Л.В. Каменева¹, О.В. Чвартацкая¹, П.А. Лосева¹, Е.С. Ершова¹,
Л.Н. Любченко², Н.Н. Вейко¹*

¹Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук,
115478 Москва, ул. Москворечье, 1; тел.: +7(499)612-81-93;
факс: +7(495)324-07-02; эл. почта: Svet-vk@yandex.ru

²Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина Российской
академии медицинских наук, Москва

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) человека используются в регенеративной медицине. Однако остается еще много вопросов, связанных с ролью различных сигнальных путей в регуляции функциональной активности стволовых клеток (СК) в организме. В очаге повреждения возрастает уровень гибели клеток организма, в крови накапливаются фрагменты ДНК погибших клеток (внеклеточная ДНК, вкДНК). Мы показали, что при контакте МСК жировой ткани с фрагментами вкДНК *in vitro* повышается уровень транскрипционной активности генома – увеличивается общее количество клеточной РНК и количество рРНК. Фрагменты вкДНК, обогащенные GC-парами (GC-ДНК), активируют TLR9-зависимый сигнальный путь: возрастает экспрессия генов *TLR9* и адаптера TLR-сигнального пути – *MyD88*. Фрагменты вкДНК, обогащенные AT-парами (AT-ДНК), не повышают экспрессию *TLR9*, однако, увеличивают количество мРНК *MyD88*. Это позволяет предположить, что AT-ДНК действует через другие рецепторы, которые, тем не менее, активируют в МСК сигнальный путь, зависимый от белка *MyD88*. Обнаружено, что фрагменты вкДНК снижают активность фермента апоптоза каспазы. Таким образом, вкДНК может существенно влиять на функциональную активность МСК, активируя TLR9 и *MyD88*-зависимые сигнальные пути в клетках и снижая уровень апоптоза.

Ключевые слова: Мезенхимальные стволовые клетки, внеклеточная ДНК, TLR9, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время достигнуты большие успехи в изучении биологии стволовых клеток (СК). Однако остается еще много вопросов, связанных с взаимодействием стволовых клеток с клетками микроокружения и ролью различных сигнальных путей в регуляции СК.

Стволовые клетки имеют несколько уникальных свойств: они существуют как неспециализированные клетки, не имеют тканеспецифических маркеров и поддерживают статус недифференцированных клеток под действием клеток микроокружения. СК обладают способностью к самоподдержанию; под действием определенных биологических сигналов они способны дифференцироваться

* - адресат для переписки

в специализированные клетки в результате асимметричного деления [1]. Из-за большого количества этических проблем при использовании эмбриональных СК, в настоящее время всё большее внимание уделяется изучению свойств СК из других источников. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются предшественниками клеток мезенхимальной линии: хрящей, костей, сухожилий, мышц, жировой ткани. Они могут быть легко выделены, в частности, из жировой ткани и быстро растут в лабораторных условиях. Кроме того, МСК способны оказывать иммуносупрессорное действие через индукцию регуляторных Т-лимфоцитов и дендритных клеток [2]. Эти свойства делают МСК привлекательным объектом для их применения в практической медицине, хотя необходимо отметить, что методы лечения стволовыми клетками находятся в стадии клинического или доклинического исследования. Кроме того, не полностью изучена регуляция МСК и сигнальные пути, активирующиеся при их взаимодействии с другими клетками, поскольку эти сигнальные пути образуют сложную сеть.

Повреждение ткани стимулирует переход СК к пролиферации, поскольку СК являются пролиферативным резервом при регенерации ткани [3]. Однако процессы, происходящие со стволовыми клетками в очаге повреждения, также остаются малоизученными.

В области повреждения, а также при патологии и опасных для генома воздействиях возрастает уровень гибели клеток организма [4, 5]. Внеклеточная ДНК (вкДНК) – это продукт деградации погибших в результате некроза или апоптоза клеток организма [6, 7], хотя существует предположение, что вкДНК также может выделяться живыми клетками (метаболическая ДНК) [8]. Показано, что вкДНК отличается по составу от геномной ДНК: вкДНК значительно обогащена GC-парами [5, 9, 10], аналогично бактериальной ДНК. Так, содержание GC-богатой (GC-ДНК) умеренно повторяющейся последовательности генома – транскрибируемой области рибосомного повтора (ТОрДНК) – в составе вкДНК в несколько раз превышает содержание этого повтора в ДНК клеточных ядер [5, 9, 10]. В то же время в составе вкДНК отмечается снижение содержания AT-богатых последовательностей [11]. Увеличение содержания во вкДНК фрагментов CpG-ДНК незначительно для клеток организма. Было показано, что ТОрДНК в составе вкДНК обладает сильным стимулирующим действием на лимфоциты периферической крови человека [4, 9] и на кардиомиоциты крысы [10]. Кроме того, обнаружено, что активирующее действие ТОрДНК на клетки иммунной системы опосредуется через белки семейства так называемых “Toll-like” рецепторов, обозначаемые как TLR9 [4]. Белки семейства TLR играют определяющую роль в координации врожденного и приобретенного ответа иммунной системы. Активация TLR при взаимодействии с молекулами патогенов различной природы является ключевым моментом в способности организма отражать потенциально патогенные микроорганизмы и вирусы. Через активацию TLR МСК могут быть вовлечены в регуляцию иммунных ответов [12].

МСК, попадая в очаг повреждения, могут контактировать с фрагментами вкДНК. Чтобы определить характер воздействия фрагментов вкДНК на физиологическую активность МСК, мы исследовали *in vitro* изменение некоторых характеристик культивируемых МСК жировой ткани в ответ на введение в среду культивирования модельных GC- и AT-обогащенных проб ДНК.

МЕТОДИКА. Поскольку содержание МСК в тканях составляет доли процента, работа с ними подразумевает необходимость выделения и размножения клеток *in vitro*. Получение МСК из жировой ткани связано с необходимостью ферментативной обработки, поскольку популяция МСК заключена в плотный межклеточный матрикс. Методическая проблема состоит также в необходимости элиминации клеток других тканей, контаминирующих с МСК. Однако при подборе оптимальных условий культивирования сопутствующие клетки элиминируются в ходе последующих пассажей.

Культивирование клеток. Мезенхимальные стволовые клетки были получены из жировой ткани операционного материала больных с аденокарциномой молочной железы, доставленного из РОНЦ РАМН в течение часа после резекции опухоли. Образец был механически измельчен в среде ДМЕМ (“ПанЭко”, Москва), содержащей 250 мкг/мл гентамицина, 60 Ед/мл пенициллина и 60 Ед/мл стрептомицина (“ПанЭко”). Ферментативную диссоциацию проводили в среде ДМЕМ, инкубируя препарат в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“РАА”, Австрия), 0,04% коллагеназы (“Sigma”) и тех же антибиотиков в течение 16 часов при 37°C. Затем клетки центрифугировали (10 мин, 200 g), перенесли в слайд-флаконы и культивировали при 37°C в среде AmnioMax C-100 Basal Medium (“Gibco”), содержащей AmnioMax Supplement C-100, 20 мкмоль/л NEPES (“ПанЭко”) и антибиотики.

Морфологию клеток оценивали визуально с использованием фазово-контрастного микроскопа. Кроме того, культуры мезенхимальных стволовых клеток при достижении субконфлюэнтности (70% монослоя) фиксировали изопропанолом и окрашивали кристаллическим фиолетовым. Клетки культуры МСК имели характерную фибробластоподобную морфологию.

Чтобы подтвердить корректность используемого способа получения МСК, для одной из культур проведён анализ экспрессии поверхностных белков (таблица).

Таблица. Маркеры гемопоэтических стволовых клеток, определенные методом проточной цитофлуориметрии.

Маркеры гемопоэтических клеток	Gp105-120	CD34	-
	Leukocyte common antigen	CD45	-
		HLA-DR	-
Молекулы ГКГ (главного комплекса гистосовместимости)		HLA-ABC	+
Молекулы адгезии	NCAM	CD44	+
	ICAM-1	CD54	+/- (low)
	VCAM	CD106	-
Рецепторы к факторам роста	endoglin	CD105	+/- (low)
	c-kit	CD117	-
Интегрины и другие маркеры	β_1 integrin	CD29	+
	$\alpha_2\beta_1$ integrin	CD49b	+/- (low)
	Thy-1	CD90	+

Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитофлуориметрии. Монослой клеток переводили в суспензию при помощи раствора Версена и промывали буферным раствором для окрашивания: фосфатно-солевой буфер (ФСБ), содержащий 1% фетальной сыворотки и 0,1% азида натрия. Окрашивание клеток проводили в том же буферном растворе с использованием антител, меченных флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) и фикоэритрином (PE) (“Becton Dickinson”, США) в течение 1 ч при 4°C. В качестве негативного контроля использовали изотипические антитела, меченные соответствующими флуоресцентными красителями того же производителя. После инкубации клетки отмывали 2 раза

УСИЛЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ КЛЕТОК ФРАГМЕНТАМИ *vk*ДНК

в 1 мл буферного раствора для окрашивания и фиксировали 2%-ным раствором параформальдегида. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре “FACSAria” (“Becton Dickinson”); данные обрабатывали с использованием программы “WinMDI”.

Было показано, что на поверхности МСК присутствуют молекулы ГКГ (главного комплекса гистосовместимости): HLA-ABC+, молекулы адгезии: CD44+, CD54 (low), CD90+, CD106+ , интегрины CD29+, CD49b (low), ростовые факторы: CD105 (low), но отсутствуют маркеры гемопоэтических клеток CD34-, CD45-, HLA-DR- и маркер к CD117-. Полученный профиль (таблица) характерен для МСК. Кроме того, клетки в присутствии соответствующего индуктора дифференцировались в адипоциты.

Пробы ДНК. В качестве модельных фрагментов CpG-ДНК генома человека использовали CpG-богатый фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора ДНК (ТорДНК) – участок от –515 до 5321 в соответствии с HSU13369, GeneBank, встроенный в вектор pBR322 (p(ТорДНК)). В качестве АТ-обогащённой ДНК использовали фрагмент 1,77 сателлита III (SatIII) – участок 1q12, хромосомы 1, также встроенный в вектор pBR322 (p(satIII)). ДНК *E. coli* выделяли из штамма MG 1655 методом фенольной экстракции. Все образцы ДНК подвергали одинаковой дополнительной очистке от липополисахаридов: последовательно проводили обработку тритоном X-114 и гельфильтрацию на носителе HW-85. МСК культивировали в присутствии p(ТорДНК) (50 нг/мл), p(SatIII) (50 нг/мл), ДНК *E. coli* (50 нг/мл) в течение 3 ч при 37°C. Результаты были подтверждены в трёх независимых экспериментах и на трёх различных культурах МСК человека.

Выделение РНК из культивируемых лимфоцитов проводили с помощью стандартной методики с использованием наборов YellowSolve (“Клоноген”, Санкт-Петербург). Выделенную РНК хранили при температуре -70°C.

ДНКазный гидролиз проводили для дополнительной очистки выделенной РНК с помощью реагентов фирмы “Силекс” (Россия). К пробе РНК объёмом 45 мкл добавляли 5 ед ДНКазы (без РНКазной активности) и 5 мкл ДНКазного буфера ($\times 10$): 100 мМ трис-НСl, pH 7,5 / 25°C, 100 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂, и оставляли на 20 минут при температуре 22°C. Реакцию останавливали кратковременным прогреванием при температуре 95°C. Для удаления ДНКазы после обработки препарата использовали сорбент BlueSorb (“Силекс”). Качество выделенной РНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Была выделена стабильная РНК без примесей РНКазного гидролиза.

Определение концентрации РНК проводили на люминесцентном спектрометре “LS 55” (“PerkinElmer”, Англия). Концентрацию РНК измеряли с использованием РНК-связывающегося красителя Quant-iT™ RiboGreen RNA reagent (MoViTec), $\lambda_{\text{возб}}=487$ нм, $\lambda_{\text{эм}}=524$ нм. К 2 мл раствора красителя (в разведении 1:2000, буфер TE (0,01 М трис-НСl, pH=7,5; 0,001 М ЭДТА)) добавляли 5 мкл раствора РНК и измеряли флуоресценцию в течение 1 минуты.

Полученные значения нормировали по числу клеток, из которых была выделена РНК. Наиболее точным методом оценки количества клеток в культуре является измерение концентрации ДНК.

Выделение ДНК МСК проводили из интерфазы, образующейся на первом этапе при выделении РНК. К интерфазе (на границе раздела водной и органической фазы), добавляли 0,1 мл лизирующего буфера (10% лаурилсаркозилат натрия, 0,1 моль/л ЭДТА) и РНКазу А (75 мкг/мл), инкубировали при 37°C 1 час. Гидролизировали протеиназой К (200 мкг/мл, 37°C, 24 часа). Проводили экстракцию насыщенным фенолом (2 раза), добавляли ацетат аммония (2 моль/л) и осаждали ДНК 0,8 объёмами изопропанола (-20°C). ДНК осаждали центрифугированием, промывали 75% водным этанолом и растворяли в 30 мкл воды.

Определение концентрации ДНК. Концентрацию ДНК определяли с использованием ДНК-связывающегося красителя Hoechst 33258 ($\lambda_{\text{возб}}=350$ нм,

$\lambda_{эм} = 450$ нм). К 2 мл раствора красителя Hoechst 33258 (0,2 мкг/мл, буфер – 0,05 М трис-НСl, рН 7,4, 0,5 М NaCl, 1 ммоль/л ЭДТА) добавляли 5 мкл раствора ДНК и измеряли флуоресценцию в течение 1 минуты. В качестве фонового сигнала брали значения флуоресценции образца ДНК после исчерпывающего гидролиза ДНКазой 1. Стандартная ошибка определения концентрации ДНК составляет 2-5%.

Определение количества мРНК генов TLR9, MyD88, TBP. Уровень экспрессии генов нормировали, выравнивая концентрации выделенных образцов РНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью набора реактивов фирмы “Силекс” с использованием фермента MuLV-RT обратной транскриптазы, согласно стандартной методике. Контролировали концентрацию кДНК, измеряя её флуориметрически. Использовали метод ПЦР в реальном времени по принципу TaqMan, прибор Rotor Gene 3000 (“Corbett Research”, Австралия). Количество мРНК анализировали в нескольких независимых опытах с помощью программного обеспечения прибора; ошибка метода составляла 2%.

Основная проблема использования метода РВ-ПЦР заключалась в поиске гена внутреннего стандарта. В ряде независимых экспериментов при действии фрагментов ДНК на МСК было обнаружено, что наиболее стабильным из трёх генов (*TBP*, *GAPDH* и *AKTβ*), обычно использующихся для нормирования полученных результатов экспрессии исследуемых генов, является ген *TBP* (TATAA-box binding protein). Полученные экспериментальные данные согласуются с литературными [13], поэтому в качестве гена внутреннего стандарта использовали *TBP*.

Использовали праймеры: *TLR9* (F: CCA CAA CAA CAT CCA CAG CCA AGT, R: TCA GGC CTT GGA AGA AGT GCA GAT, P: FAM – TTC AGC GGC AAT GCA CTG GGC CAT AT – BQH1); *MyD88* (F: TCC ACA GTG ATG CCT ACT GAT GCT, R: ATG CAG ATG AGA GGT GGA CCC ATT, P: FAM – ACA CCG CCC ATT CCA CTT CCT CCT T– BQH1); *TBP* (F: GCC CGA AAC GCC GAA TAT, R: CCG TGG TTC GTG GCT CTC T, P: R6G – ATC CCA AGC GGT TTG CTG CGG – BQH1).

Связывание антител с TLR9 анализировали с помощью антител к TLR9, меченных флуоресцирующим красителем фикоэритрином – PE-anti-TLR9 (eB72-1665) “eBioscience” (США). Клетки фиксировали в фосфатном буфере, содержащем 3% формальдегид (PBS, рН 7,4), пермеабилizировали в буфере PBS, содержащем 0,4% тритон X-100 (10 и 5 мин соответственно), обрабатывали антителами к TLR9 30 мин в темноте. Клеточные препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа. Количество антиген-позитивных клеток определяют как % флуоресцирующих клеток при просмотривании 200 клеток за вычетом % флуоресцирующих клеток, наблюдаемых в препарате отрицательного контроля.

Активность каспазы-3 определяли с помощью флуоресцирующего субстрата Z-DEVD-AFC (“Molecular Probes Europe BV”, Нидерланды). Реакцию проводили при 33°C в течение 1 часа в буфере: 50 mM HEPES, рН 7,5, 10% сахарозы, 10 mM ДТТ, 0,1% CHAPS, 25мкМ Z-DEVD-AFC. Флуоресценцию измеряли на приборе “Perkin Elmer LS55” (США), при $\lambda_{возб} = 400$ нм, с $\lambda_{эм} = 490$ нм. Активность относили к количеству ДНК в анализируемой пробе.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартного пакета программ Statgraphics. Средние значения величин сравнивали с использованием t-критерия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Повышение транскрипционной активности МСК при действии на них модельных фрагментов ДНК. В данной работе исследовано действие двух фрагментов в составе вДНК – ТOpДНК и СatIII, введенных в среду культивирования клеток в концентрации 50 нг/мл. Выбор анализируемых последовательностей определялся их нуклеотидным составом. Плазида р(ТOpДНК) содержит высокий процент GC-пар и обогащена метилированными CpG-динуклеотидами. Фрагменты ТOpДНК устойчивы к двунитевым разрывам

УСИЛЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ КЛЕТОК ФРАГМЕНТАМИ вкДНК

при нуклеазном гидролизе [14] и накапливаются в составе вкДНК [5]. Фрагмент ТOpДНК включает сайты связывания с рецепторами TLR9 [15] и может выступать в качестве лиганда этого рецептора. Некоторые участки вставки ТOpДНК содержат последовательности – супрессоры TLR9 (короткие повторы с общей формулой $(G)_n$), которые могут конкурентно ингибировать действие TLR9-активирующих участков последовательности р(ТOpДНК). Плазмида р(СatIII) обогащена АТ-парами (область 1q12 1-й хромосомы человека), которые не содержат ни лигандов, ни супрессоров TLR9, однако в составе вектора рВR322 присутствуют CpG-богатые участки ДНК. В качестве положительного контроля использовали ДНК *E. coli* в концентрации 50 нг/мл, которая является известным лигандом, взаимодействующим с рецепторами TLR9 [16].

Изменения в транскрипционной активности генома мы оценивали, измеряя общее количество клеточной РНК в присутствии фрагментов ДНК. Обнаружилось, что наибольшее возрастание транскрипционной активности генома происходит при действии р(ТOpДНК) и р(СatIII) – соответственно в 1,6 ($P=0,99$; $t=14,9>2,4$) и в 1,5 ($P=0,99$; $t=12,5>2,4$) раза. ДНК *E. coli* стимулирует синтез РНК в МСК, но в меньшей степени, чем фрагменты, присутствующие в эндогенной вкДНК – в 1,3 раза ($P=0,99$; $t=8,5>2,4$) (рис. 1а).

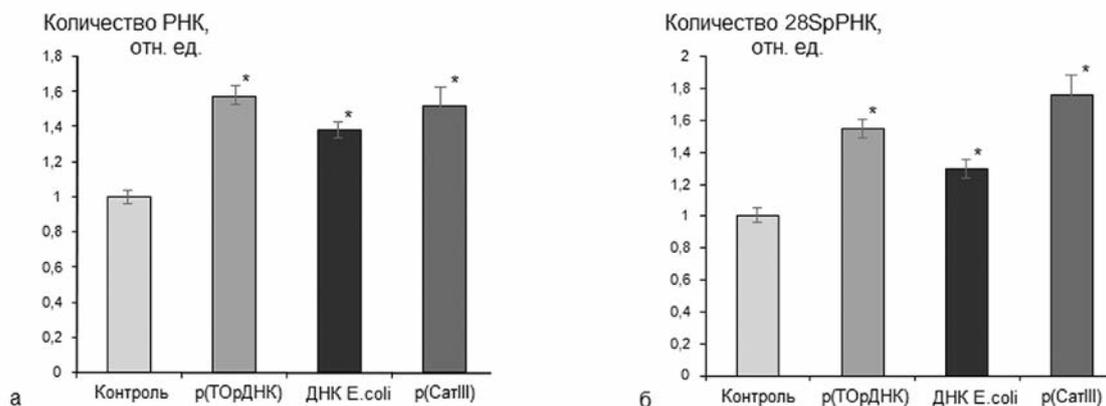


Рисунок 1.

а - Концентрация РНК (отн. ед.) в МСК при действии фрагментов вкДНК (ТOpДНК и СatIII) и ДНК *E. coli*. **б** - Количество 28SpРНК (отн. ед.), полученное методом нерадиоактивной количественной гибридизации. * - достоверные различия средних значений по t-критерию ($p=0,99$; $t>2,4$).

Полученные результаты были подтверждены с помощью метода нерадиоактивной количественной гибридизации суммарной РНК с зондами, содержащими фрагменты 18SpРНК и 28SpРНК. Считается, что из двух основных рРНК (28S и 18S) 28SpРНК лучше всего отражает целостность пула мРНК. Отмечается её высокое содержание в образце суммарной РНК (в среднем на 10 мкг образца суммарной РНК приходится около 6 мкг 28SpРНК и 2 мкг 18SpРНК). Экспрессия генов рРНК менее подвержена воздействиям, влияющим на степень представленности мРНК. Было показано, что в случае стимуляции МСК р(ТOpДНК) и р(СatIII) статистически значимо повышается концентрация 28pРНК – соответственно в 1,55 ($P=0,99$; $t=13,6>2,4$) и в 1,76 ($P=0,99$; $t=17,8>2,4$) раза. ДНК *E. coli* также повышает уровень 28SpРНК в 1,3 раза ($P=0,99$; $t=8,5>2,4$) (рис. 1б).

Таким образом, на модельной системе мы показали, что при контакте МСК как с CG-ДНК, так и с AT-ДНК значительно повышается транскрипционная активность генома. При воздействии на МСК фрагментов экзогенной ДНК *E. coli*

уровень транскрипции возрастает не столь значительно (в 1,3 раза, а для ряда культур остается неизменным, либо статистически недостоверно снижается). Возможно, это связано с тем, что фрагменты экзогенной бактериальной ДНК и эндогенной вкДНК вызывают экспрессию разных генов и активируют различные сигнальные пути в МСК.

Рецепторы *TLR9* принимают участие в реализации действия *CG-ДНК* на МСК. *ТОрДНК* является потенциальным лигандом *TLR9*, вставка *СатIII* не содержит участков связывания с *TLR9*, а ДНК *E. coli* является признанным стимулятором этого рецептора. МСК экспрессируют все известные рецепторы семейства *TLR* [12]. Поэтому мы предположили, что изменения в функциональной активности МСК в присутствии проб ДНК происходят с участием *TLR9*-сигнального пути.

Для того чтобы ответить на вопрос, активируется ли *TLR9*-сигнальный путь при действии фрагментов вкДНК, исследовали количество мРНК *TLR9* и адаптера *TLR*-сигнального пути – *MyD88* в ответ на стимуляцию МСК фрагментами *p(ТОрДНК)* и *p(СатIII)* и ДНК *E. coli* (50 нг/мл, 3 ч) методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) в варианте *TaqMan*.

На рисунке 2 приводятся данные по изменению количества мРНК *TLR9* и *MyD88*. При действии фрагментов *p(ТОрДНК)* и ДНК *E. coli* на МСК наблюдается статистически значимое увеличение количества мРНК белка *TLR9* соответственно в 3,0 ($P=0,99$; $t=18,3>2,2$) и в 2,9 ($P=0,99$; $t=17,2>2,2$) раза по отношению к контролю (рис. 2а), *p(СатIII)* не оказывает влияния на экспрессию гена *TLR9* ($P=0,99$; $t=0,36<2,2$).

При культивировании МСК в присутствии *p(ТОрДНК)*, *p(СатIII)* и ДНК *E. coli* наблюдается увеличение количества мРНК белка *MyD88* соответственно в 5,0 ($P=0,99$; $t=9,4>2,4$), 4,8 ($P=0,99$; $t=8,9>2,4$) и в 3,0 ($P=0,99$; $t=5,9>2,4$) раза (рис. 2б) по отношению к контролю.

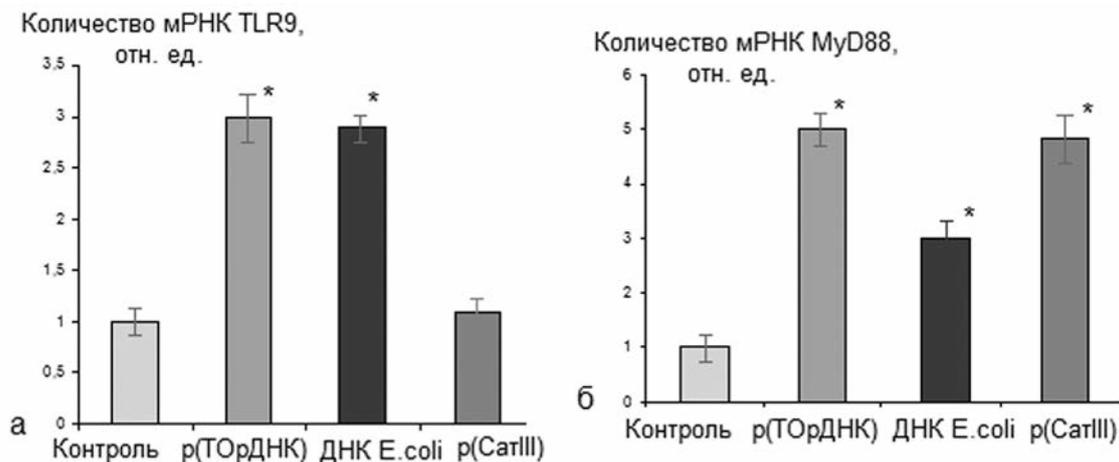


Рисунок 2.

Уровень экспрессии гена *TLR9* (а) и *MyD88* (б) в МСК при действии фрагментов вкДНК (*ТОрДНК* и *СатIII*) и ДНК *E. coli*. * - достоверные различия средних значений по t-критерию.

Для визуализации рецепторов *TLR9* и подтверждения активации экспрессии генов этих рецепторов фрагментами *ТОрДНК* на уровне синтеза белка, были использованы антитела к *TLR9*, меченные флуоресцирующим красителем фикоэритрином – PE-anti-*TLR9* (рис. 3). Интенсивность флуоресценции возрастала в 1,7 раза после культивирования МСК в присутствии *p(ТОрДНК)*.

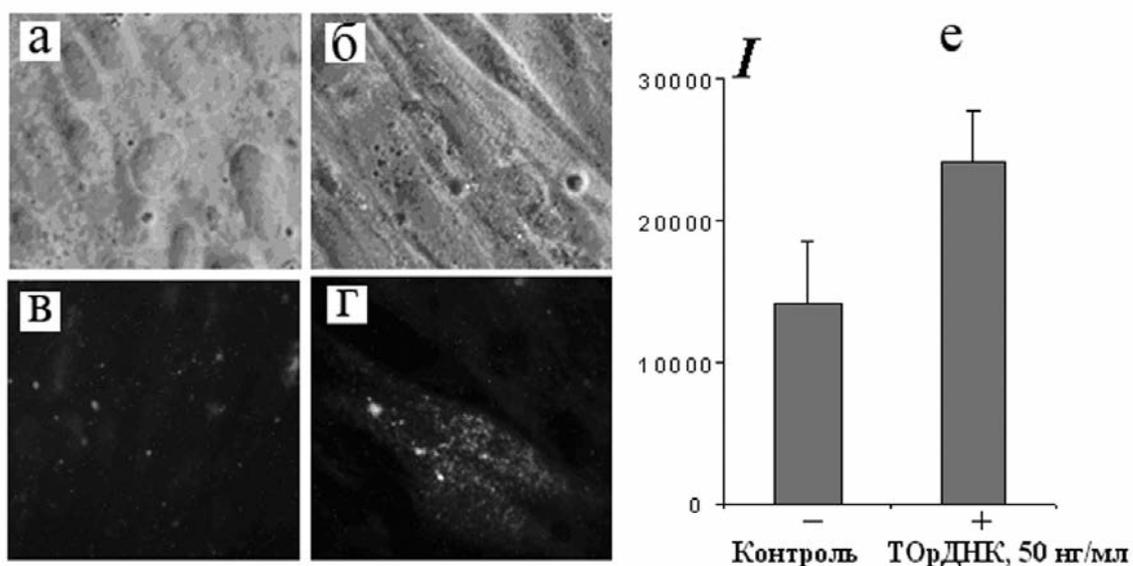


Рисунок 3.

Определение рецепторов TLR9 с помощью антител к TLR9, меченных флуоресцирующим красителем фикоэритрином - PE-anti-TLR9. а, б - контрольные клетки, в, г - после действия фрагмента ТОРДНК в концентрации 50 нг/мл, 3 часа. а, в - фото в видимом свете (увеличение X100), б, г - флуоресценция (возбуждение 495 нм). е - Средняя интенсивность флуоресценции в расчёте на одну клетку (I - интенсивность флуоресценции, отн.ед.).

Полученные данные свидетельствуют о том, что пути воздействия фрагментов р(ТОРДНК) и р(СатIII) на МСК отличаются. ТОРДНК, обогащенная неметилированными CpG-динуклеотидами, опосредует свое воздействие через TLR9, о чем свидетельствует повышение экспрессии гена *TLR9* на уровне мРНК и белкового продукта. Поскольку не наблюдается повышения экспрессии гена *TLR9* при добавлении фрагментов СатIII к среде культивирования МСК, можно предположить, что СатIII действует через другие рецепторы, которые, тем не менее, активируют сигнальный путь, зависимый от белка MyD88.

Последние исследования показали, что МСК, экспрессируя белки семейства TLR, могут отвечать на лиганды этих рецепторов и являются ранее непризнанными игроками иммунной системы с дихотомичной функцией, аналогично антиген-представляющим клеткам [17]. Таким образом, можно предположить, что фрагменты вкДНК, стимулируя МСК, могут играть роль регуляторов иммунного ответа.

Снижение ферментативной активности каспазы 3 в МСК при действии проб ДНК. В норме апоптоз является частью регуляторного механизма, контролирующего численность популяции в нормальной ткани. Апоптоз поврежденных клеток может служить механизмом защиты генетической информации в организме [18]. Апоптоз имплантированных МСК влияет на эффективность терапии, поэтому важно исследовать влияние фрагментов вкДНК на апоптоз МСК. Мы проследили изменения активности одного из ферментов апоптоза – каспазы 3 при действии модельных фрагментов вкДНК: р(ТОРДНК) и р(СатIII) и ДНК *E. coli* (50 нг/мкл, 3 ч) с помощью флуоресцирующего субстрата QAc-DEVD-AFC. Суммируя результат двух независимых экспериментов на двух различных культурах МСК, выявили (рис. 4), что действие всех проб ДНК снижало активность каспазы 3 в клеточных лизатах: р(ТОРДНК) – на (12±3)% ($P=0,95$; $t=5,7>2,1$), р(СатIII) – на (40±17)% ($P=0,95$; $t=9,9>2,1$), а ДНК *E. coli* – на (31±7)% ($P=0,95$; $t=16,3>2,1$).

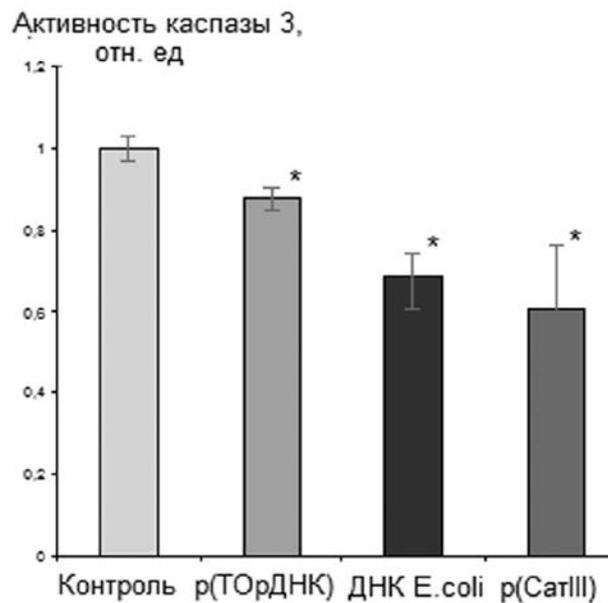


Рисунок 4.

Активность каспазы 3 в клеточных белковых лизатах после культивирования МСК в присутствии p(ТорДНК), p(CatIII), ДНК *E.coli* и в контроле, отн.ед. Объединены данные двух независимых опытов. * - средние значения достоверно различаются по t-критерию.

Высказываются предположения, что активация TLR-сигнального пути играет существенную роль в защите МСК от апоптоза [19]. При действии всех трёх проб ДНК мы наблюдали повышение экспрессии *MyD88* – ключевого адаптера большинства TLRs, что создает платформу для активации митоген-активируемых протеинкиназ – MAPK (mitogen-activated protein kinase) и трансактивирующих факторов и в конечном итоге приводит к транслокации в ядро транскрипционного фактора NF-κB. Известно, что каскад MAPK задействован в передаче сигналов МСК от интегрин бета-1 [20]. Интегрины и факторы роста обеспечивают жизнеспособность МСК за счёт усиления экспрессии антиапоптотических [21] генов и подавления экспрессии проапоптотических [22]. Кроме того, в подавлении апоптоза МСК может быть задействован PI3K/Akt – сигнальный путь, поскольку показано, что Akt регулирует активацию NF-κB, и его активация повышает выживаемость МСК [23]. Поскольку из трёх проб ДНК p(CatIII) вызывала наибольшее снижение активности каспазы 3, и при этом не столь значительно стимулировала экспрессию *MyD88* и *TLR9*, можно предположить, что в устойчивости МСК к апоптозу играют роль и другие сигнальные пути. Возможно, значительная роль принадлежит активации трансмембранных рецепторов семейства Notch [24]. Более вероятно, что в регуляции апоптоза в МСК участвует сложная переплетающаяся сеть регуляторных путей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, CG- и AT-обогащенные фрагменты эндогенной вкДНК, также, как и экзогенная бактериальная ДНК, оказывают влияние на функционирование МСК. С одной стороны они существенно стимулируют транскрипцию генов в МСК, активируя TLR9- и MyD88-зависимый сигнальный путь, с другой – ингибируют апоптоз, повышая жизнеспособность МСК. Цель наших дальнейших исследований – определить, каким образом изменяется профиль экспрессии генома МСК при изменении концентрации и состава последовательностей внеклеточной ДНК. Обнаруженное нами влияние вкДНК на функционирование МСК следует учитывать при проведении клинических испытаний по трансплантации стволовых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morrison S.J., Kimble J. (2006) *Nature*, **441**(7097), 1068-1074.
2. Stagg J. (2007) *Tissue Antigens*, №1, 1-9.
3. Lehrer M.S., Sun T.T., Lavker R.M. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**(19), 2867-2875.
4. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Egolina N.A., Efremova L.V., Veiko N.N. (2009) *Mutat. Res.*, **669**, 155-161.
5. Вейко Н.Н., Иванова С.М., Костюк С.В., Шубаева Н.О., Ермаков А.И., Еголина Н.Ф., Рязанцева Т.Ф., Сперанский А.И. (2007) *Иммунология*, **28**(3), 147-151.
6. Pisetsky D.S. (2004) *Rheum. Dis. Clin. North. Am.*, **30**, 575-587.
7. Choi J.J., Reich C.F., Pisetsky D.S. (2005) *Immunology*, **115**, 55-62.
8. van der Vaart M., Pretorius P.J. (2008) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1137**, 18-26.
9. Костюк С.В., Замулаева И.А., Агапова Р.К., Ермаков А.В., Саенко А.С., Орлова Н.В., Смирнова С.Г., Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. (2008) *Радиационная биология и радиационная экология*, **48**(1), 5-13.
10. Bulicheva N., Veiko N., Fidelina O., Mkrtyumova N., Neverova M. (2007) *Clinical Chemistry, Abstracts for CNAPS V*, **53**(10), 15-16.
11. Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**(42), 16266-16271.
12. Pevsner-Fischer M., Morad V., Cohen-Sfady M., Rousso-Noori L., Zanin-Zhorov A., Cohen S., Cohen I.R., Zipori D. (2007) *Blood*, **109**, 1422-1432.
13. Fink T., Lund P., Pilgaard L., Rasmussen J.G., Duroux M., Zachar V. (2008) *BMC Mol. Biol.*, **9**, 98.
14. Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. (2000) *Радиационная биология и радиационная экология*, **40**, 396-404.
15. Вейко Н.Н., Шубаева Н.О., Иванова С.Н., Сперанский А.И., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. (2006) *Бюллетень экспериментальной медицины*, **142**(3), 313-316.
16. Magnusson M., Tobes R., Sancho J., Pareja E. (2007) *J. Immunol.*, **179**, 31-35.
17. Morrison S.J., Spradling A.C. (2008) *Cell*, **132**, 598-611.
18. Potten C.S., Wilson J.W., Booth C. (1997) *Stem Cells*, **15**(2), 82-93.
19. Wang Z.J., Zhang F.M., Wang L.S., Yao Y.W., Zhao Q., Gao X. (2009) *Cell Biol. Int.*, **33**, 665-674.
20. Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Tarone G., Defilippi P. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6622-6632.
21. Zhang Z., Vuori K., Reed J.C., Ruoslahti E. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6161-6165.
22. Reginato M.J., Mills K.R., Paulus J.K., Lynch D.K., Sgroi D.C., Debnath J., Muthuswamy S.K., Brugge J.S. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 733-740.
23. Armstrong L., Hughes O., Yung S. et al. (2006) *Hum. Mol. Genet.*, **15**(11), 1894-1913.
24. Shawber C., Nofziger D., Hsieh J.J., Lindsell C., Bögl O., Hayward D., Weinmaster G. (1996) *Development*, **122**, 3765-3773.

Поступила: 29. 03. 2011.

**CELL-FREE DNA FRAGMENTS INCREASE TRANSCRIPTION IN HUMAN
MESENCHYMAL STEM CELLS, ACTIVATE TLR-DEPENDENT SIGNAL PATHWAY
AND SUPPRESS APOPTOSIS**

***S.V. Kostyuk¹, E.M. Malinovskaya¹, A.V. Ermakov¹, T.D. Smirnova¹, L.V. Kameneva¹,
O.V. Chvartatskaya¹, P.A. Loseva¹, E.S. Ershova¹, L.N. Lyubchenko², N.N. Veiko¹***

¹Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Moskvorechye, 1, Moscow, 115478 Russia; tel.: +7(499)612-81-93; fax: +7(495)324-07-02; e-mail: Svet-vk@yandex.ru

²Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

Human mesenchymal stem cells (MSCs) are now widely adopted in regenerative medicine. However, many questions on the role of different signaling pathways in the regulation of stem cell (SC) functional activity within the organism remain unanswered. In damaged regions the level of cell death increases and DNA fragments from dead cells (cell-free DNA, cfDNA) are accumulated in blood. We showed that in adipose-derived MSCs exposed *in vitro* to cfDNA fragments the transcription level increased (the total amount of cellular RNA and the rRNA amount rose). GC-rich CfDNA fragments (GC-DNA) activated the TLR9-dependent signal pathway: the expression of *TLR9* and of TLR9-signaling pathway adapter – *MyD88* – was up-regulated. AT-rich DNA fragments did not increase the *TLR9* expression, though, the *MyD88* expression level rose. So we suggest that AT-DNA acts via some other receptors that nevertheless activate *MyD88*-dependent signalling in MSCs. We also showed that cfDNA fragments decreased the activity of caspase, an apoptotic enzyme. So, cfDNA can significantly influence the functional activity of MSC by activating TLR9- and *MyD88*-dependent signal pathways and lowering the apoptosis level.

Key words: mesenchymal stem cells, cell-free DNA, TLR9, apoptosis.