

УДК 577.218

©Коллектив авторов

ОБОГАЩЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА CpG-БОГАТЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ГЕНОМА ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ ПРОДУКЦИИ КЛЕТКАМИ IL-6 И TNF- α ПУТЁМ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NF- κ B

А.И. Сперанский¹, С.В. Костюк², Е.А. Калашикова³, Н.Н. Вейко^{2}*

¹Научно-исследовательский Институт ревматологии им. В.А. Насоновой,
115522, Москва, Каширское шоссе 34А

²Медико-генетический научный центр,
115478, Москва, ул. Москворечье 1; тел.: 8-495-612-79-86; эл. почта: gibgene@rambler.ru

³Московский областной НИИ акушерства и гинекологии,
101000, Москва, Покровка, 22А

Известно, что внеклеточная ДНК (вкДНК) плазмы крови больных ревматоидным артритом (РА) обогащена фрагментами CpG-богатых геномных последовательностей, которые кодируют лиганды рецепторов TLR9 (Вейко и соавт., 2006). Нами показано, что вкДНК больного РА и модельные CpG-богатые фрагменты генома человека, введенные в среду культивирования мононуклеаров периферической крови (PBMC) здоровых доноров, стимулируют экспрессию генов сигнального пути TLR9–MyD88–NF- κ B, что приводит к значительному увеличению концентрации провоспалительных цитокинов – IL-6 и TNF- α – в среде культивирования. Необогащенная CpG геномная ДНК человека инертна в отношении стимуляции синтеза IL-6 и TNF- α в PBMC. Предложена схема, объясняющая потенциальную роль вкДНК в индукции и поддержании повышенного уровня провоспалительных цитокинов в клетках, подвергнутых действию повреждающих факторов.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, внеклеточная ДНК, TLR9, NF- κ B

DOI 10.18097/PBMC20166203331

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) – аутоиммунное заболевание, которое характеризуется эрозивным артритом и широким спектром внесуставных (системных) проявлений, поражает 1% населения Земли, приводит к ранней утрате работоспособности и сокращению продолжительности жизни. РА достаточно часто встречается и в РФ [1]. При РА преобладает иммунный ответ Th1-типа, при котором наблюдается избыточная продукция провоспалительных цитокинов [2]. Этиология РА до сих пор однозначно не выяснена. Важную роль в развитии этого заболевания могут играть различные внешние воздействия, например, УФ-излучение, инфекции, стрессы различной природы, курение и т.д. Поиск индукторов, которые обуславливают длительное поддержание в организме высокого уровня провоспалительных цитокинов, остается актуальной проблемой ревматологии. Интересно, что все перечисленные факторы, приводящие к развитию и прогрессированию РА, объединяет одно общее свойство – способность индуцировать гибель клеток организма.

В последние годы стало очевидным, что иммунная система может активироваться не только благодаря таким чужеродным стимулам, как бактерии и вирусы, но и под воздействием эндогенных биомолекул, которые появляются в циркуляции в результате гибели клеток организма. Пул этих биомолекул назван молекулярными паттернами,

ассоциированными с повреждением (damage-associated molecular patterns; DAMPs) [3]. DAMPs вызывают изменения функциональной активности здоровых клеток организма, индуцируя синтез про- и противовоспалительных цитокинов, стерильное воспаление, адаптивный ответ. Из молекул DAMPs в настоящее время наиболее изучены белки (прежде всего, HMGB1), липопротеины и продукты их окисления. ДНК погибших клеток, которая попадает в циркуляцию, до недавнего времени не рассматривалась в качестве биологически активной составляющей пула DAMPs, поскольку известно, что геномная ДНК млекопитающих обладает слабым иммуностимулирующим действием.

Вместе с тем, история изучения ДНК, локализованной в межклеточной среде, насчитывает не одно десятилетие. В 1940-х годах было обнаружено, что ДНК млекопитающих заключена не только в ядре клеток, но находится в периферической крови [4]. Циркулирующие вне клеток фрагменты ДНК называют внеклеточной ДНК (вкДНК), внехромосомной ДНК, ДНК плазмы, ДНК сыворотки, а в англоязычной литературе – cell-free DNA, circulating DNA, CNAPS [5]. Существуют две основные гипотезы о происхождении вкДНК в плазме/сыворотке крови: образование пула внеклеточных нуклеиновых кислот в результате гибели клеток (“теория клеточной гибели”), активная секреция живыми клетками (теория “метаболической ДНК”) [5]. Последняя гипотеза до сих пор не подтверждена. Повышенный интерес

* - адресат для переписки

к вкДНК связан с возможностью её использования для диагностики разных типов рака по измененной опухолевой вкДНК, также выявления патологии беременности и нарушений развития плода, а также для оценки риска повреждающих факторов, в том числе, ионизирующего и УФ-излучения.

В последнее время внимание привлекают биологические функции вкДНК [6]. При патологии и опасных для генома воздействиях изменяется концентрация вкДНК в плазме крови, содержание различных фрагментов ядерной и митохондриальной ДНК в составе вкДНК, а также такие эпигенетические характеристики вкДНК, как метилирование и окислительная модификация азотистых оснований. Эти изменения способствуют появлению у вкДНК новых свойств, необходимых для её биологической активности. Интересно отметить, что впервые взаимосвязь между свойствами вкДНК и активностью РА была обнаружена Зборовским еще в 60-е годы [7].

Геномная ДНК (гДНК), выделенная из клеток млекопитающих, не обладает, в отличие от бактериальной ДНК, выраженной биологической активностью, что связывают с низким содержанием последовательностей, кодирующих лиганды рецепторов врожденного иммунитета TLR9. Низкое содержание GC-пар в гДНК человека обуславливает низкий уровень неметилированных СрG-мотивов, которые узнаются рецепторами TLR9. вкДНК обогащена GC-богатыми последовательностями по сравнению с ядерной ДНК. Среднее содержание GC-пар в вкДНК здоровых людей составляет 53,7% [8], в то время как ядерная ДНК содержит 41% GC-пар [9]. Методом полногеномного секвенирования показано, что в вкДНК увеличено содержание фрагментов хромосомы 19, количество GC-пар в которой выше, чем в остальных хромосомах человека [10].

Данные об обогащении вкДНК СрG-последовательностями согласуются с ранее обнаруженным нами повышенным содержанием фрагментов транскрибируемой области рибосомного повтора (рДНК). Обогащение в несколько раз вкДНК гипометилированной рДНК наблюдается при хронической патологии, которая сопровождается усилением гибели клеток (ишемическая болезнь сердца, хроническая артериальная гипертензия, РА) [11, 12], а также при внешнем хроническом повреждающем воздействии (ионизирующее излучение) [13]. Анализ нуклеотидной последовательности рДНК и опубликованных данных по метилированию рДНК человека выявил в составе рДНК большое количество неметилированных СрG-содержащих мотивов связывания с рецепторами TLR9 ([11] и рис. 1). TLR9 – трансмембранные внутриклеточные рецепторы, расположенные на мембране эндосом, они содержат СрG-мотив для закрепления лиганда и внутриклеточную высококонсервативную область, опосредующую при участии адаптерных молекул взаимодействия между рецепторами и молекулами сигнального пути. Известно, что связывание бактериальной ДНК с TLR9 сопровождается активацией митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) и фактора транскрипции NF-κB, увеличением

синтеза ряда провоспалительных цитокинов и выработкой активных форм кислорода [14].

Мы высказали предположение, что вкДНК плазмы крови больного РА с высоким содержанием СрG-богатых последовательностей может активировать в лимфоцитах человека синтез провоспалительных цитокинов путём активации сигнального пути TLR9-MyD88-NF-κB→(IL-6, TNF-α). Это предположение подтверждено в нашей работе.

МЕТОДИКА

Клетки

Суммарный пул моноклеаров периферической крови (РВМС) трех здоровых доноров выделяли в системе фиколл-урографин из гепаринизированной периферической крови. Донорами периферической крови были сотрудники МГНЦ РАМН в возрасте от 25 до 50 лет. Работа с РВМС доноров одобрена региональным этическим комитетом МГНЦ РАМН (соглашение №5). После выделения клетки (10⁶/мл) культивировали в течение 3 ч при 37°C в среде, содержащей раствор Хенкса, 1 ммоль/л HEPES ("Fluka", Швейцария) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("HyClone", США). Далее в среду культивирования добавляли пробы ДНК и инкубировали в течение 3 ч или 24 ч.

Ингибирование пути TLR9

TLR9 блокировали олигонуклеотидом TCCTGGCGGGAAGT (2088) ("Синтол", Москва) в конечной концентрации 3 мкг/мл или хлорохином в концентрации 2 мкг/мл ("Boots Company Plc", Великобритания). После добавления ингибитора клетки инкубировали (30 мин при 37°C) до добавления проб ДНК.

Пробы ДНК

ВкДНК больного РА. Больной К., 54 года. Проходил лечение в НИИ ревматологии им. В.А. Насоновой. Было получено информированное согласие больного на использование его вкДНК в научно-исследовательских целях. Диагноз: серопозитивный РА, развернутая стадия 1-го года; III-я клинико-рентгенологическая стадия с преимущественным поражением крупных суставов; С-реактивный белок – 8 мг%, ревматоидный фактор – 1/2560; СОЭ – 60 мм/ч. Содержание рДНК (фрагмент от –515 до 5321 в соответствии с HSU13369, GenBank) составляет 5 пг/нг вкДНК (определено ранее методом нерадиоактивной количественной гибридизации [11]).

ВкДНК здорового донора. Добровольный донор N – мужчина 55 лет, сотрудник МГНЦ РАМН. По данным диспансеризации практически здоров, не имеет хронических заболеваний. Содержание рДНК (фрагмент от –515 до 5321) составляет 1,7 пг/нг вкДНК [11].

ВкДНК среды культивирования РВМС. Клетки осаждали центрифугированием (460 g). вкДНК выделяли из супернатанта методом фенольной экстракции (см. ниже).

Модельные фрагменты. В качестве модельного фрагмента использовали обогащенный CpG фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора человека (–515...5321 н. в соответствии с HSU13369, GenBank), встроенный в вектор pBR322 (CpG-ДНК). В качестве контрольной вставки (АТ-обогащённая ДНК, АТ-ДНК) использовали фрагмент 1,77 сателлита III (SatIII) – участок 1q12, хромосомы 1, также встроенный в вектор pBR322 (АТ-ДНК). Плазмидную ДНК и ДНК *E. coli* (штамм MG 1655) выделяли по стандартной методике [15]. Дополнительную очистку CpG-ДНК, АТ-ДНК и ДНК *E. coli* проводили методом фенольной экстракции (см. ниже).

Выделение и очистка проб ДНК. Для выделения образцов вкДНК из плазмы периферической крови здорового донора и больного РА, среды культивирования РВМС, а также для дополнительной очистки образцов плазмидной ДНК и ДНК *E. coli* использовали экстракцию органическими растворителями. К 1 мл плазмы крови (или растворов предварительно очищенной плазмидной или бактериальной ДНК [15]) добавляли 0,1 мл лизирующего буфера (10% лаурилсаркозилат натрия, 0,1 моль/л ЭДТА) и РНКазу А (“Serva”, США) в концентрации 75 мкг/мл, инкубировали в течение 1 ч при 37°C, гидролизывали протеиназой К (“AppliChem”, Германия) в концентрации 200 мкг/мл, 37°C, 24 ч. Далее экстрагировали 2 раза фенолом, насыщенным буфером (pH 7,4) (“Alfa Aesar”, Германия), фенол-хлороформом (1:1) и хлороформом с изоамиловым спиртом (24:1), (“Химмед”, Россия). ДНК осаждали 0,6 объёма изопропанола (“Scharlau”, Испания) в присутствии ацетата аммония (2 моль/л) и инкубировали в течение 24 ч при -20°C. После осаждения ДНК центрифугированием осадок промывали 75% водным этанолом и растворяли в 30 мкл воды.

Очистка ДНК от липополисахаридов. Образцы ДНК очищали от липополисахаридов с использованием тритона X-114 (“Merck”, Германия) и гель-фильтрации на носителе HW-85 [16] или Endotoxin Extractor (“Силекс”, Россия), который, согласно протоколу производителя (http://www.sileks.com/ru/download/Endotoxin_Extractor.pdf), является эффективным средством удаления липополисахаридов. Доказательством отсутствия в пробах ДНК биологически активных липополисахаридов служили два факта: (1) пробы не обладали способностью влиять на уровень экспрессии в РВМС рецептора TLR4 (связывает липополисахарид); (2) исчерпывающий гидролиз ДНКазой 1 приводил к блокированию активации экспрессии MyD88, что указывает на отсутствие стимуляции рецептора TLR4.

Определение концентрации ДНК. Концентрацию ДНК определяли с использованием ДНК-связывающего красителя Hoechst 33258 (“Sigma”, США). К 2 мл раствора красителя Hoechst 33258 (0,2 мкг/мл, буфер – 0,05 М Трис-НСl pH 7,4, 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА) добавляли 5 мкл раствора ДНК и измеряли флуоресценцию в течение 1 мин. В качестве фонового сигнала использовали значения флуоресценции образца ДНК

после исчерпывающего гидролиза ДНКазой 1. Стандартная ошибка определения концентрации ДНК составляет 2-5%.

Определение экспрессии генов

РНК из культивируемых РВМС выделяли с помощью стандартной методики с использованием наборов YellowSolve (“Клоноген”, Россия) и хранили при температуре -70°C. Для дополнительной очистки РНК применяли гидролиз ДНКазой (реагенты фирмы “Силекс”). К пробе РНК объёмом 45 мкл добавляли 5 ед. ДНКазы (без РНКазной активности) и 5 мкл ДНКазного буфера (×10): 100 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 25°C, 100 мМ MgCl₂, 10 мМ CaCl₂, и оставляли на 20 мин при 22°C. Реакцию останавливали кратковременным прогреванием при 95°C. Для удаления ДНКазы 1 после обработки препарата использовали сорбент BlueSorb (“Силекс”). Качество РНК оценивали с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию РНК определяли на люминесцентном спектрометре “LS 55” (“Perkin Elmer”, Великобритания). Концентрацию РНК измеряли с использованием РНК-связывающегося красителя Quant-iTTMRiboGreen RNA reagent (“MoBiTec”, Бельгия).

Количественное определение мРНК генов TLR9, TLR4, MyD88, TBP. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью реактивов фирмы “Силекс” и обратной транскриптазы MuLV-RT согласно стандартной методике, выравнивая концентрации образцов РНК. Концентрацию кДНК контролировали, измеряя её флуориметрически. ПЦР в реальном времени проводили с использованием TaqMan и прибора RotorGene 3000 (“CorbettResearch”, Австралия). Количество мРНК анализировали в нескольких независимых опытах методом 2^{-ΔΔCt} с помощью программного обеспечения к прибору [17]. Ошибка метода составляла 2%. Результаты рассчитывали в относительных единицах – по соотношению уровня экспрессии гена при воздействии образца ДНК и в контроле (интактных клетках). Все значения нормировали, используя в качестве внутреннего стандарта уровень экспрессии гена TBP.

Использовали праймеры (“Синтол”, Россия): **TLR9** (F: CCACAACAACATCCACAGCCCAAGT; R: TCAGGCCTTGGAAGAAGTGCAGAT; P: FAM – TTCAGCGGCAATGCACATGGGCCATAT – BQH1); **MyD88** (F: TCCACAGTGATGCCCTACTGATGCT; R: ATGCAGATGAGAGGTGGACCCATT; P: FAM – ACACCGCCCATTCACCTTCCTCCTT – BQH1); **TBP** (F: GCCCGAAACGCCGAATAT; R: CCGTGG-TTCGTGGCTCTCT; P: R6G – ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGG – BQH1).

Определение количества мРНК генов NF-κB1, RELA, MAP4K4, TLR4, IL-6, TNF-α. Использовали набор для ПЦР в реальном времени (SYBRGreenPCRMasterMix, “Applied Biosystems”, США) и прибор StepOnePlus (“Applied Biosystems”). Количество мРНК определяли в нескольких независимых опытах с помощью программного обеспечения прибора; ошибка метода – 2%; в качестве внутреннего стандарта использовали ген TBP.

Использовали праймеры (“Синтол”): **NF-κB1** (CAGATGGCCCATACCTTCAAAAT; CGGAAACGA-AATCCTCTCTGTT); **MAP4K4** (GAGCCACAG-GTA-CAGTGGTC; AAGCCTTTTGGGTAGGGTCAG); **TNF** (ATCAATCGGCCGACTATCTC; GCAATG-ATCCCAAAGTAGACCTG); **IL-6** (AAATTCGGT-ACATCCTCGACGGCA; AGTGCCTCTTTGCTG-CTT-TCACAC); **RELA** (CCCACGAGCTTGTA-GAAAGG; GGATCCCAGGTTCTGGAAAC); **TLR4** (ACCTGA-GCT-TTAATCCCCTGA; GGCTCTGATAT-GCCCCATCTT); **TBP** (F: 5'-GCCCCGAAACGCC-GAATAT-3'; R 5'-CCGTGGTTCGTGGCTCTCT-3') – внутренний стандарт.

Определение концентрации IL-6 и активности TNF-α в среде культивирования лимфоцитов.

РВМС культивировали в присутствии различных проб ДНК (50 нг/мл, 24 ч, 37°C) и осаждали центрифугированием. Концентрацию IL-6 (нг/мл) в среде определяли с использованием стандартных наборов для ELISA (“Cytokine”, Россия). Уровень сигнала определяли с помощью планшетного ридера “EnSpire” (Финляндия).

Активность TNF-α в среде, выраженную в стандартных единицах (МЕ/мл), определяли по степени лизиса чувствительных к этому цитокину клеток фибросаркомы мыши [18]. В качестве стандарта использовали рекомбинантный TNF-α человека (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Гипотезу о различиях независимых выборок проверяли с помощью метода Манна-Уитни, позволяющего сравнивать выборки малого объема, в которых не установлен вид распределения параметра. Все результаты получены не менее чем в трёх независимых опытах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы определить, влияет ли СрG-состав вкДНК на активацию TLR9-зависимого сигнального пути в клетках крови человека, мы выделили РВМС из периферической крови трёх здоровых доноров. Прежде всего, охарактеризовали собственную вкДНК

культивируемых клеток, которая присутствует в среде культивирования. С этой целью вкДНК выделяли через 3 ч от начала культивирования с использованием экстракции органическими растворителями. Концентрация вкДНК в среде культивирования варьировала от 42 до 59 нг/мл (52±5 нг/мл, n=3).

Ранее [19] определили среднее содержание маркерной рДНК (фрагмент транскрибируемой области рибосомного повтора –515...5321 н. в соответствии с HSU13369, GenBank) в составе вкДНК и гДНК в образцах клеток. Содержание рДНК в 1 нг вкДНК или яДНК одного и того же образца РВМС было одинаковым во всех образцах и варьировало от 0,75 до 0,8 пг/нг ДНК. В то же время содержание рДНК в плазме тех же доноров варьировало от 2 до 4 пг/нг, то есть в 1,5-2 раза превышало содержание рДНК в гДНК (p<0,05). Таким образом, в культивируемых РВМС не наблюдалось обогащения вкДНК последовательностями рДНК по сравнению с яДНК, как это обнаружено в плазме крови. По-видимому, механизм накопления СрG-богатых последовательностей в вкДНК действует только в том случае, когда более фрагментированные АТ-ДНК элиминируются из кровотока путём почечной фильтрации [20].

С целью изменения концентрации и СрG-состава вкДНК в среду культивирования клеток спустя 3 ч от начала культивирования добавляли различные пробы ДНК в концентрации 50 нг/мл. В таблице и на рисунке 1 приведены характеристики суммарной вкДНК и номера проб. В качестве модельных фрагментов использовали две линейаризованные плазмиды рВР322, содержащие СрG- или АТ-богатую вставку, (соответственно СрG-ДНК и АТ-ДНК). Вставка СрG-ДНК (проба 5) содержит фрагмент транскрибируемой области рДНК; среднее содержание СрG-повторов в ней составляет 13,8%. Вставка АТ-ДНК (проба 6) содержит фрагмент сателлита III человека; среднее содержание СрG-повторов – 4,1%. Вектор рВР322 включает 7,1% СрG-повторов. В вкДНК больного РА (проба 4) увеличено количество рибосомного повтора. Среднее содержание СрG-повторов в составе рДНК составляет 14,1%. ДНК *E. coli* (проба 7) содержит 7,5% СрG. Таким образом, рДНК и плазмидная СрG-ДНК характеризуются наибольшей плотностью СрG-повторов (рис. 1).

Таблица. Характеристика использованных проб вкДНК

№	Проба ДНК, добавленная в среду культивирования РВМС	Концентрация вкДНК в среде, нг/мл (n = 3)	Содержание рДНК в составе вкДНК, пг/нг (n = 3)
1	Не добавляли (контроль)	52±5*	0,8±0,2
2	вкДНК плазмы крови здорового донора	102±5	1,7±0,5
3	гДНК лимфоцитов	102±5	0,8±0,3
4	вкДНК плазмы крови больного РА	102±5	5±1
5	Плазмида СрG-ДНК	102±5	252
6	Плазмида АТ-ДНК	102±5	-
7	ДНК <i>E. coli</i>	102±5	-

Примечание: * - собственная концентрация вкДНК в среде культивирования.

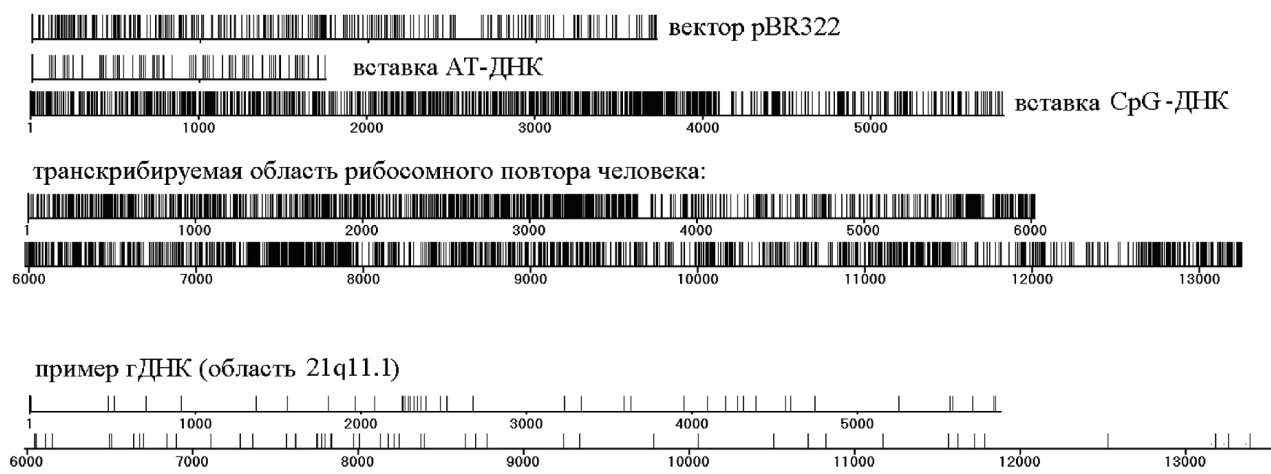


Рисунок 1. Распределение CpG-повтора в составе модельных проб ДНК и в составе рДНК, которая накапливается во внеклеточной ДНК больных РА. Указано положение нуклеотида и CpG-повтора (вертикальные чёрточки). Для сравнения приведено распределение CpG-повтора в произвольно выбранном фрагменте гДНК, содержащем 42% GC-пар.

Изменение CpG-состава вкДНК стимулирует увеличение экспрессии генов *TLR9* и *MyD88*

РВМС культивировали в присутствии изменённой вкДНК в течение 3 ч, далее осаждали, выделяли РНК и определяли количество мРНК генов, ассоциированных с сигнальным путём *TLR9*. Увеличение концентрации вкДНК в среде в 2 раза без изменения содержания маркерного CpG-богатого повтора при добавлении гДНК (пробу 3 сравнивали с пробой 1, таблица) не приводит к увеличению экспрессии *TLR9* (рис. 2). При изменении содержания рДНК в вкДНК среды путём добавления вкДНК здорового донора (проба 2), вкДНК больного РА с высоким содержанием маркера (проба 4) или модельного фрагмента рДНК в составе плазмиды CpG-ДНК (проба 5) экспрессия *TLR9* возросла в 1,3, 3,5 и 2,7 раза соответственно. Плазмида с AT-ДНК (проба 6) не влияла на уровень мРНК *TLR9*. ДНК *E. coli* (проба 7), классический лиганд *TLR9*, вызывает ожидаемый эффект – повышает количество РНК *TLR9* в 5,5 раза. Если за 30 мин до изменения состава вкДНК в среду культивирования вводили олигонуклеотид – ингибитор *TLR9* (3 мкг/мл) или ингибитор, изменяющий pH в эндосомах, хлорохин (2 мкг/мл), то пробы ДНК №4 и №5 теряли способность активировать экспрессию *TLR9*. Таким образом, увеличение содержания CpG-богатой последовательности в составе вкДНК среды культивирования РВМС приводит к повышению экспрессии гена рецептора *TLR9*, что указывает на возможную активацию соответствующего сигнального пути. Одновременно с экспрессией *TLR9* проанализировали экспрессию гена рецептора *TLR4*, лигандами которого являются липополисахариды. Липополисахариды в следовых количествах могут содержаться в пробах ДНК. Используемые образцы ДНК практически не влияли на уровень экспрессии гена *TLR4* ($p > 0,05$).

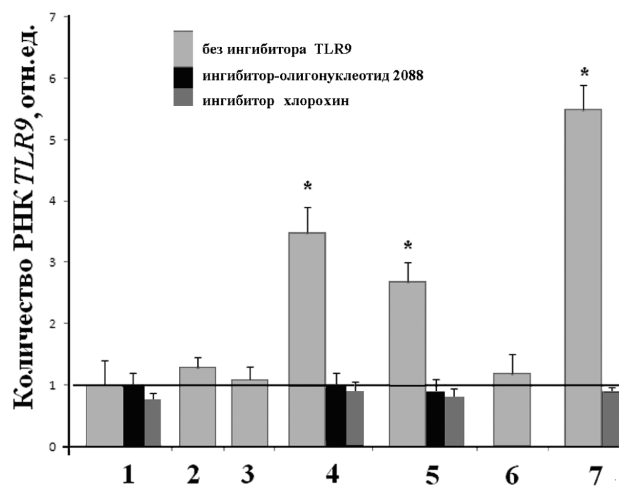


Рисунок 2. Влияние CpG-состава вкДНК на уровень экспрессии гена *TLR9*. РВМС трёх доноров культивировали в присутствии различных проб ДНК, которые вводили на 3 ч в среду культивирования в концентрации 50 нг/мл. Количество РНК *TLR9* определено методом ПЦР в реальном времени. Номера проб приведены в таблице. Чёрные и тёмно-серые узкие столбики: за 30 мин до добавления проб ДНК в среду вводили соответственно олигонуклеотид – ингибитор рецепторов (3 мкг/мл среды) или хлорохин (2 мкг/мл). Здесь и на других рисунках приведены средние значения для образцов клеток трёх доноров и стандартное отклонение. * - статистическое значимое отличие от контроля ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни).

Анализ изменений содержания мРНК гена *MyD88* (адаптера рассматриваемого сигнального пути) в ответ на изменения концентрации и CpG-состава вкДНК подтвердил предположение об активации *TLR9*-зависимого каскада (рис. 3). Изменение концентрации вкДНК при добавлении гДНК (проба 3) без изменения содержания CpG-богатой последовательности не приводило к увеличению

количества мРНК *MyD88*. Изменение содержания рДНК в составе вкДНК среды при добавлении вкДНК здорового донора (проба 2), вкДНК больного РА с высоким содержанием рДНК (проба 4) или модельного фрагмента рДНК в составе плазмиды с GC-ДНК (проба 5) приводило к увеличению экспрессии *MyD88* в 1,2, 4,3 и 2,8 раза соответственно. Плазмида с AT-ДНК (проба 6) не влияла на уровень мРНК *MyD88*. ДНК *E. coli* (проба 7) вызывала увеличение количества РНК в 4,5 раза (рис. 3).

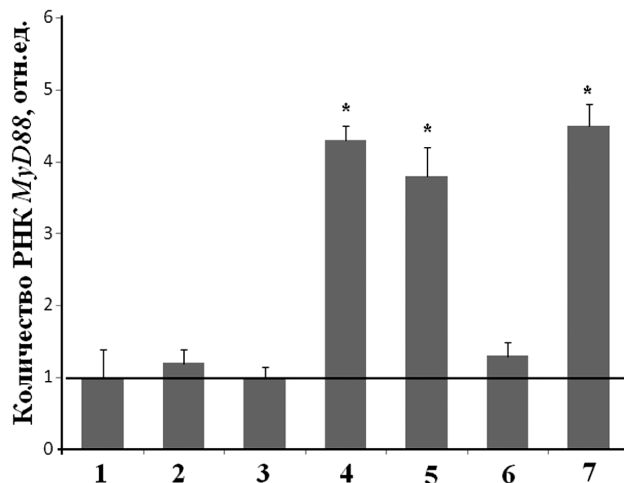


Рисунок 3. Влияние СрG-состава вкДНК на уровень экспрессии гена *MyD88*. Условия опыта см. в подписи к рисунку 2.

В присутствии проб, подвергнутых исчерпывающему гидролизу ДНКазой 1, полностью блокировалось увеличение экспрессии генов *TLR9* и *MyD88* ($p > 0,05$). Это наблюдение говорит о том, что именно фрагменты ДНК стимулируют экспрессию *TLR9* и *MyD88*. Интересно отметить, что синтетические олигонуклеотиды – лиганды *TLR9*, в концентрации 1-30 мкг/мл вызывают активацию рассматриваемого сигнального пути, что на 1-2 порядка выше, чем в случае проб, использованных нами.

Изменение GC-состава вкДНК приводит к активации экспрессии генов сигнального пути NF-κB

Известно, что увеличение экспрессии генов *TLR9* и *MyD88* при стимуляции клеток бактериальной ДНК вызывает возрастание активности фактора NF-κB, который регулирует транскрипцию ряда генов, в том числе, генов провоспалительных цитокинов [14]. Чтобы подтвердить активацию сигнального каскада, связанную с увеличением активности этого фактора транскрипции, мы проанализировали изменение экспрессии нескольких генов, включая гены цитокинов IL-6 и TNF-α (рис. 4). СрG-состав вкДНК изменяли с помощью модельной последовательности – плазмиды с СрG-ДНК, содержащей фрагмент рибосомного повтора человека (проба 5, таблица). Как следует из рисунка 4, при увеличении содержания рДНК в среде культивирования через 24 ч в клетках в несколько раз возрастает экспрессия генов *NF-κB1*, *RELA*, *MAP4K4*, вовлечённых в проведение сигнала

от рецепторов TLR9, в результате чего активируется фактор NF-κB и увеличивается экспрессия генов цитокинов IL-6 и TNF-α.

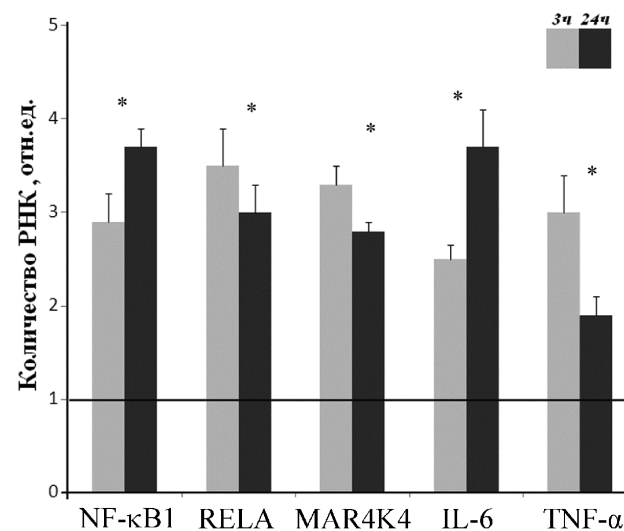


Рисунок 4. Влияние повышенного СрG-состава вкДНК на экспрессию генов сигнального пути NF-κB и цитокинов IL-6 и TNF-α. СрG-состав изменяли, добавляя в среду культивирования лимфоцитов пробы 5 (СрG-ДНК) в концентрации 50 нг/мл. Обозначения: серые столбики - 3 ч культивирования, чёрные - 24 ч.

Таким образом, можно ожидать, что при увеличении содержания СрG в составе вкДНК в межклеточной среде возрастёт концентрация цитокинов, важных для жизнедеятельности клетки. С целью подтверждения этого предположения мы определили концентрацию белка IL-6 в среде культивирования лимфоцитов с использованием метода иммуноферментного анализа, и активность белка TNF-α методом определения цитотоксичности (рис. 5). PBMC, которые культивировали в присутствии обогащенных СрG вкДНК (плазмида с СрG-ДНК, вкДНК больного РА и бактериальная ДНК), синтезируют и выделяют во внеклеточную среду значительные количества IL-6 и TNF-α. Интересно, что СрG-ДНК человека более эффективно стимулируют экспрессию IL-6, чем бактериальная ДНК.

Нами показано, что накопление в составе вкДНК СрG-ДНК человека сопровождается активацией синтеза провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α в культивируемых PBMC здоровых доноров. Можно предложить гипотетическую схему развития хронического воспаления при действии факторов самой различной природы на клетки организма (рис. 6). В популяциях клеток всегда присутствуют субпопуляции с повышенной чувствительностью к повреждающим агентам, даже если уровень воздействия не очень значителен (на рис. 6 такая клетка обозначена номером 1). Эту малочисленную субпопуляцию называют клетками “мутаторного фенотипа”, “адаптивных мутаций”, клетками “онтогенетического резерва” [21, 22]. Клетки “мутаторного фенотипа” погибают в первую очередь при минимальном воздействии. Механизм гибели клеток зависит от типа повреждающего фактора и его

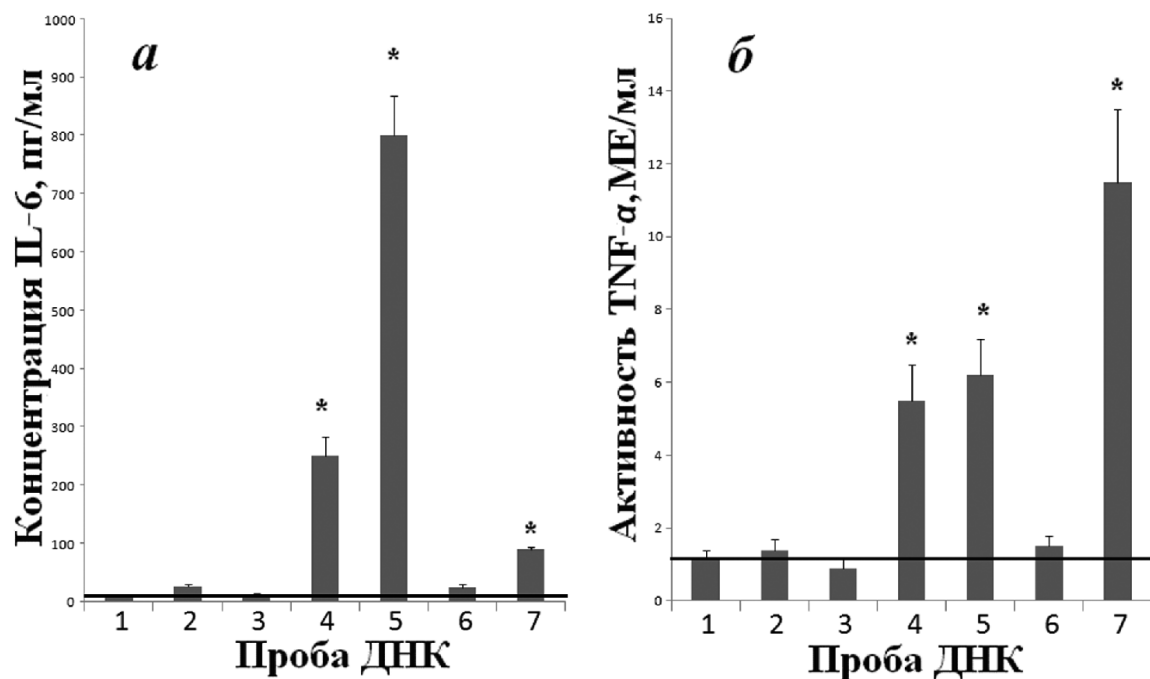


Рисунок 5. Влияние CpG-состава вкДНК на концентрацию IL-6 (а) и активность TNF-α (б) в среде культивирования PBMC человека. Номера проб приведены в таблице.

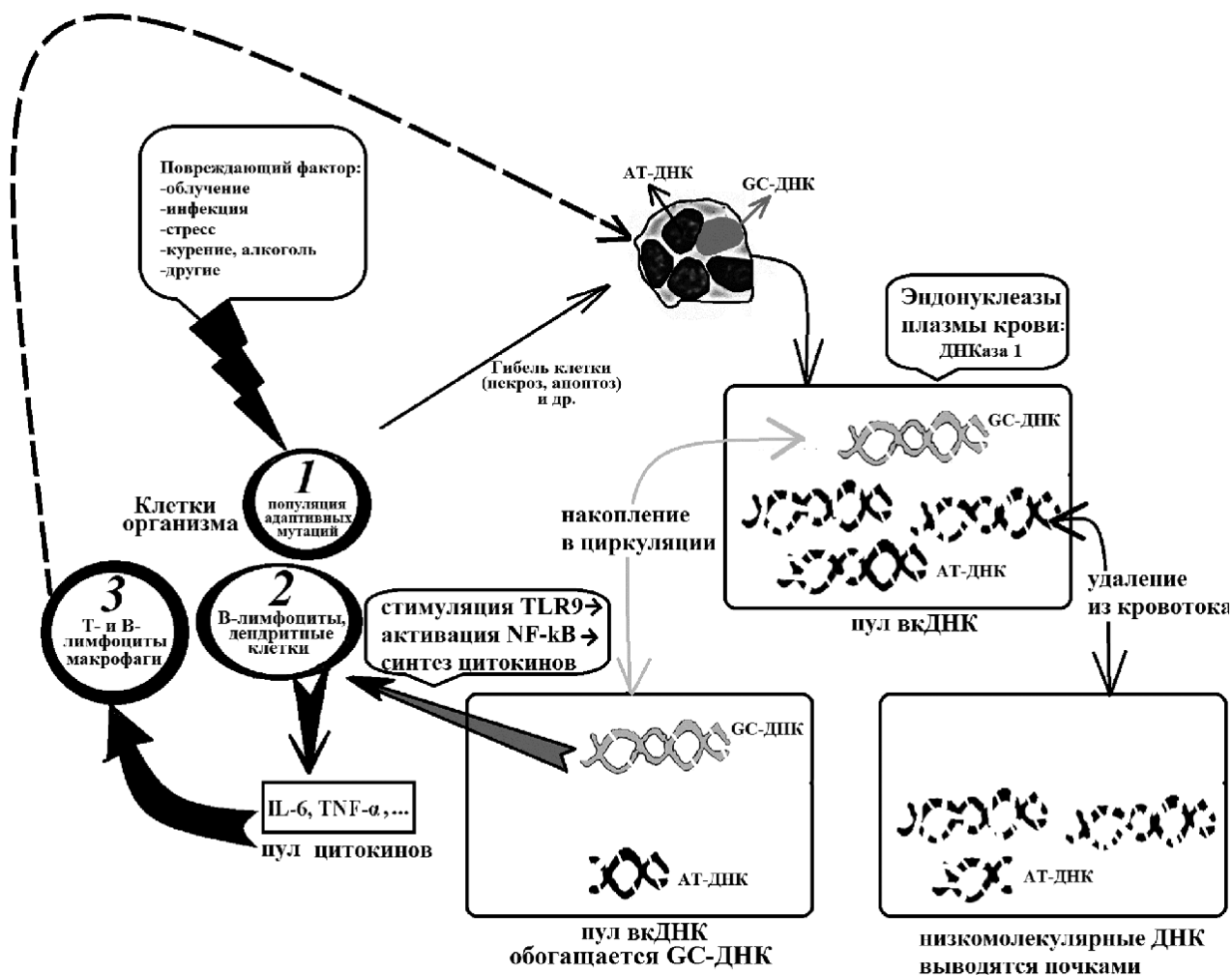


Рисунок 6. Схема, иллюстрирующая возможную роль вкДНК в поддержании длительного воспаления. Пояснения в тексте.

“дозы” (интенсивность и длительность воздействия). Большие “дозы”, например ионизирующего излучения, вызывают гибель клеток по механизму некроза. При этом содержимое погибших клеток вытекает во внеклеточную среду. Малые “дозы” повреждающего фактора индуцируют апоптоз. ДНК апоптотических клеток также появляется в среде, пополняя пул вкДНК, в этом процессе принимают участие макрофаги.

гДНК человека содержит последовательности, которые сильно различаются по содержанию GC-пар и СрG-повтора. В состав ядерной ДНК входят GC-богатые участки (обозначены на схеме серым цветом). Например, геном человека содержит около 450 копий рДНК длиной 13,3 т.п.н. [23]. Промоторы примерно 40% генов человека включают СрG-островки (длиной около 1,5 т.п.н.) [9]. СрG-богатые участки ДНК содержат до 70-80% GC-пар, вследствие чего у них повышена температура плавления двойной спирали, а, следовательно, и устойчивость к образованию двухцепочечных разрывов при накоплении одноцепочечных разрывов, которые вносят эндонуклеазы как циркулирующие в крови, так и присутствующие в апоптотической клетке. В последнее время получены данные о составе, структуре и механизмах действия различных дезоксирибонуклеаз крови человека, таких как ДНКазы I и II, фосфодиэстераза I (см. обзор [24]). Показано, что лактоферрин и иммуноглобулины также могут гидролизовать нуклеиновые кислоты [24]. Иммуноглобулины класса G и/или M с ДНК-гидролизующей активностью обнаружены в сыворотке крови больных с аутоиммунными заболеваниями [24]. Несмотря на разнообразие присутствующих в плазме крови дезоксирибонуклеаз, основным ферментом, определяющим ДНК-гидролизующую активность крови, является ДНКаза I [24], активность которой регулируется ингибиторами, в том числе мономерным актином (G-актином), природным ингибитором ДНКазы I в организме человека.

Содержащие СрG-ДНК фрагменты, циркулируют в крови в виде высокомолекулярных биополимеров. АТ-ДНК в тех же условиях распадается на низкомолекулярные фрагменты и выводится путём почечной фильтрации. В моче человека обнаружена низкомолекулярная ДНК длиной менее 100 п.н. [25]. Геном человека содержит всего ~41% GC-пар [9], но в результате описанного процесса содержание GC-пар в вкДНК может увеличиваться [8, 10]. При этом содержание отдельных СрG-ДНК, например, рибосомного повтора, может возрастать более чем на порядок [11-13].

Неиммуногенность геномной ДНК обусловлена не только низким содержанием СрG-ДНК, но и высоким уровнем метилирования СрG-участков, что блокирует их активность в качестве лигандов TLR9. Однако СрG-островки в промоторах генов, транскрибируемых в клетках различного типа, неметилированы. Транскрибируемая область рибосомного повтора человека также неметилирована в большинстве копий повтора [26]. По-видимому, значительное накопление СрG-последовательностей

в составе вкДНК даже при слабом воздействии повреждающего фактора приводит к появлению у вкДНК биологической активности в отношении тех клеток человека, которые экспрессируют (или потенциально могут экспрессировать) рецепторы TLR9 (на схеме такая клетка обозначена номером 2). Согласно опубликованным данным, на изменение концентрации СрG-ДНК в составе циркулирующей вкДНК могут реагировать плазматоидные дендритные клетки [27], ВММС, В-лимфоциты [28].

Стимуляция TLR9 индуцирует активацию фактора NF-κB, который регулирует экспрессию ряда провоспалительных цитокинов. Появление в кровотоке цитокинов, которые взаимодействуют с клетками организма, экспрессирующими соответствующие рецепторы цитокинов (Т- и В-лимфоциты, макрофаги, клетки эндотелия и т.д.; на схеме клетка номер 3), приводит к развитию воспаления, окислительному стрессу и гибели небольшой части клеток, ДНК которых пополняет пул вкДНК и в составе вкДНК вновь обогащается СрG-последовательностями [12].

Таким образом, даже небольшое воздействие, может индуцировать длительное поддержание синтеза провоспалительных цитокинов в организме. Кроме того, сами цитокины обладают способностью стимулировать активацию NF-κB.

Известно, что различные воздействия, индуцирующие гибель клеток, приводят к увеличению эндонуклеазной активности плазмы крови, то есть ускоряют процесс, направленный на обогащение вкДНК СрG-последовательностями [12, 24]. СрG-вкДНК действуют на ВММС как бактериальная ДНК, стимулируя экспрессию TLR9. Изменение СрG-состава вкДНК, наблюдаемое при аутоиммунной [11] и сердечно-сосудистой патологии [12], приводит к появлению биологической активности вкДНК, сравнимой с действием агентов инфекционной природы (бактериальная ДНК).

СрG-богатые геномные фрагменты в составе циркулирующей вкДНК действуют не только на клетки крови. Ранее мы обнаружили, что модельные СрG-ДНК и вкДНК больных с высоким содержанием маркера СрG-обогащения вкДНК (рДНК) вызывают изменения функциональной активности клеток эндотелия человека [29], кардиомиоцитов [30] и нейронов крысы [31], а также стволовых клеток человека, выделенных из жировой ткани [32]. Доказано увеличение активности фактора NF-κB при стимуляции TLR9 в стволовых клетках. Таким образом, вкДНК, которая образуется в организме при действии любого повреждающего клетки эндо- или экзогенного агента, можно рассматривать как системный фактор, вызывающий изменение функциональной активности различных клеток, что проявляется и повышением уровня синтеза провоспалительных цитокинов. По-видимому, вкДНК с высоким СрG-составом следует представлять как потенциальную мишень для терапии хронического воспалительного процесса. Для блокирования негативного действия СрG-вкДНК можно предложить два возможных подхода:

(1) удаление CpG-вкДНК из кровотока. Можно предложить использование специфических антител к CpG-богатой ДНК, которые образуют с ней прочные комплексы. Ранее мы показали, что константы ассоциации комплексов CpG-богатой ДНК с антителами к ней на порядок выше, чем константы ассоциации комплексов с тотальной гДНК. В организме здоровых людей такие антитела присутствуют в небольшом количестве [33];

(2) добавление в кровоток ингибиторов TLR9, рецепторов цитокинов или других ингибиторов компонентов рассматриваемого сигнального пути. Однако этот вариант менее предпочтителен, поскольку CpG-богатые фрагменты вкДНК будут оставаться в кровотоке. При этом возможен дальнейший процесс: при повышенном уровне свободных радикалов в организме (окислительный стресс) в этой ДНК будут окисляться азотистые основания. В результате образуется так называемая “окисленная” вкДНК, которая обладает ещё большей биологической активностью [6]. “Окисленная” ДНК легко проникает в клетки и вызывает синтез активных форм кислорода. При этом также увеличивается транскрипционная активность фактора NF-κB, но уже не через TLR9-зависимый путь.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

ВкДНК больного РА и модельные CpG-богатые фрагменты генома человека подобно бактериальной ДНК активируют в PBMC здоровых доноров сигнальный путь TLR9-MyD88–NF-κB. В результате во внеклеточной среде значительно возрастает концентрация провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF-α.

Чтобы разработать реальные методы регулирования CpG-состава вкДНК с целью снижения её негативного действия на клетки организма, необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Насонова В.А., Фоломеева О.М., Эрдеc III.Ф. (2009) Тер. архив, **81**, 5-9.
- Насонов Е.Л. (2013) Тер. архив, **85**, 4-7.
- Goh F.G., Midwood K.S. (2012) Rheumatology (Oxford), **51**, 7-23.
- Mandel P., Metais P. (1948) CR Acad. Sci. Paris, **142**, 241-243.
- Galeazzi M., Morozzi G., Piccini M., Chen J., Bellisai F., Fineschi S., Marcolongo R. (2003) Autoimmun. Rev., **2**, 50-55.
- Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. (2013) Oxid. Med. Cell Longev., **649**-747.
- Zborovskij A.B., Skolnikova-Bespalova V.A. (1967) Fysiatr. Revmatol. Vestn., **45**, 270-276.
- Suzuki N., Kamataki A., Yamaki J., Homma Y. (2008) Clin. Chim. Acta., **387**, 55-58.
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C. et al. (2001) Nature, **409**, 860-921.
- Fan H.C., Blumenfeld Y.J., Chitkara U., Hudgins L., Quake S.R. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **105**, 16266-16271.
- Вейко Н.Н., Шубаева И.О., Иванова С.М., Сперанский А.И., Ляпунова Н.А., Спитковский Д.М. (2006) Бюлл. экспер. биол. мед., **142**, 282-285.
- Вейко Н.Н., Булычева Н.В., Рогинок О.А., Вейко Р.В., Ершова Е.С., Коздоба О.А., Кузьмин В.А., Виноградов А.М., Юдин А.А., Сперанский А.И. (2008) Биомед. химия, **54**, 78-93.
- 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) Радиацион. биол. Радиоэкол., **48**, 5-13.
- Vollmer J. (2006) Int. Rev. Immunol., **25**, 155-181.
- Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. (1984) Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование (пер. с англ.), Мир, М.
- Ma R., Zhao J., Du H.C., Tian S., Li L.W. (2012) Anal. Biochem., **424**, 124-126.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Methods, **25**, 402-408.
- Fish H., Gifford J.E. (1989) J. Immunol. Methods, **57**, 311-325.
- Конькова М.С. (2011) Внеклеточная ДНК – фактор сигнализации при радиационном эффекте свидетеля. Дисс. канд. наук, МГНЦ РАМН, Москва.
- Вейко Н.Н., Спитковский Д.М. (2000) Радиацион. биол. Радиоэкол., **40**, 396-404.
- Спитковский Д.М. (1992) Радиацион. биол. Радиоэкол., **32**, 382-400.
- Nagasawa H., Little J.B. (2002) Mutat. Res., **508**, 121-129.
- Вейко Н.Н., Егорова Н.А., Радзивиц Г.Г., Нурбаев С.Д., Косякова Н.В., Шубаева И.О., Ляпунова Н.А. (2003) Мол. биол., **37**, 409-419.
- Черепанова А.В., Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. (2007) Биомед. химия, **53**, 488-496.
- Шелепов В.П., Арсенин С.Л., Ботезату И., Алехина Р.П., Потапова Г.И., Горбунов О.В., Мелконян О.С., Уманский С.Р., Лихтенштейн А.В. (1997) Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, **8**, 13-17.
- Вейко Н.Н. (2001) Структурно-функциональная организация рибосомных генов человека. Дисс. докт. наук, МГНЦ РАМН, Москва.
- Hilbert T., Bongartz J., Weisheit C., Knüferrmann P., Baumgarten G., Hoeft A., Poth J.M. (2013) PLoS One, **8**, e65024.
- Klonowska-Szymczyk A., Wolska A., Robak T., Cebula-Obrzut B., Smolewski P., Robak E. (2014) Mediators Inflamm., **381**-418.
- Ефремова Л.В., Алексеева А.Ю., Конькова М.С., Костюк С.В., Ершова Е.С., Смирнова Т.Д., Кононова И.Л., Вейко Н.Н. (2010) Бюлл. экспер. биол. мед., **149**, 156-160.
- Bulicheva N., Fidelina O., Mkrumova N., Neverova M., Veiko N., Bogush A., Bogush M., Roginko O. (2008) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **273**-277.
- Efremova L.V., Kostyuk S.V., Khaspekov L.G., Veiko N.N. (2010) in: Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (P. Gahan, ed.), Springer Science+Business Media B.V., pp. 213-218.
- Костюк С.В., Малиновская Е.М., Ермаков А.В., Смирнова Т.Д., Каменева Л.В., Чвартацкая О.В., Лосева П.А., Ершова Е.С., Любченко Л.Н., Вейко Н.Н. (2012) Биомед. химия, **58**, 673-683.
- Вейко Н.Н., Костюк С.В., Ермаков А.В., Калашикова Е.Л., Кунавцева О.А., Рязанцева Т.А., Сперанский А.И. (2007) Бюлл. экспер. биол. мед., **144**, 277-282.

Поступила: 02. 09. 2014.
Принята к печати: 15. 03. 2016.

**ENRICHMENT OF EXTRACELLULAR DNA FROM THE CULTIVATION MEDIUM
OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS WITH GENOMIC CpG RICH FRAGMENTS
RESULTS IN INCREASED CELL PRODUCTION OF IL-6 AND TNF-α VIA ACTIVATION
OF THE NF-κB SIGNALING PATHWAY**

A.I. Speranskii¹, S.V. Kostyuk², E.A. Kalashnikova³, N.N. Veiko²

¹Nasonova Research Institute of Rheumatology, Moscow, Russia

²Research Centre of Medical Genetics (RCMG),

1 Moskvorechie str., Moscow, 115478 Russia; tel.: 8-495-612-79-86; e-mail: ribgene@rambler.ru

³Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russia

Previously, it was found that blood plasma extracellular DNA (ecDNA) of patients with rheumatoid arthritis (RA) is enriched with CpG-rich genomic DNA fragments, which contain TLR9 ligands (Veiko et al., 2006). In this study we have demonstrated that ecDNA of a RA patient and model fragments added to a cultivation medium of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donors stimulate expression of genes for the TLR9–MyD88–NF-κB signaling pathway; this leads to a significant increase in concentrations of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF-α in the cultivation medium. Human genomic DNA non-enriched with the CpG sequences did not stimulate IL-6 and TNF-α synthesis in PBMC. A scheme explaining the potential role ecDNA in the induction and maintenance of increased levels of the proinflammatory cytokines under conditions damaging the human cells has been proposed.

Key words: rheumatoid arthritis (RA), extracellular DNA (ecDNA), TLR9, NF-κB