

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ИНДУЦИБЕЛЬНЫЕ СУБЪЕДИНИЦЫ ИММУНОПРОТЕАСОМЫ, МАКРОФАГАМИ, ИНФИЦИРОВАННЫМИ *M. BOVIS* BCG И *M. TUBERCULOSIS* H37RV*

¹С. Н. АНДРЕЕВСКАЯ, ²Т. Г. СМЕРНОВА, ²А. В. ТИМОФЕЕВ, ¹Е. Е. ЛАРИОНОВА, ¹Л. Н. ЧЕРНОУСОВА

EXPRESSION OF GENES ENCODING IMMUNOPROTEASOME SUBUNITS INDUCIBLE BY MACROPHAGES INFECTED WITH *M. bovis* BCG AND *M. Tuberculosis* H37RV

¹S. N. ANDREEVSKAYA, ²T. G. SMIRNOVA, ²A. V. TIMOFEEV, ¹E. E. LARIONOVA, ¹L. N. CHERNOUSOVA

¹ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН,

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, г. Москва

С целью изучения влияния вакцинного штамма *M. bovis* BCG и вирулентного лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv на экспрессию индуцибельных субъединиц иммунопротеасомы макрофагами изучали экспрессию генов с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с кДНК, полученной с мРНК в результате реакции обратной транскрипции. Результаты инфицирования учитывали на 1-е, 2-е и 3-и сут. после заражения.

Выявлена разница в динамике экспрессии *lmp7*, заключающаяся в снижении количества транскриптов на 3-и сут. после инфицирования вирулентным штаммом *M. tuberculosis* по сравнению с вакцинным штаммом. Предположили, что ингибирование транскрипции этой субъединицы при заражении вирулентным штаммом *M. tuberculosis* может вести к блокированию сборки всей иммунопротеасомы и к снижению ее функциональной активности.

Показан стимулирующий эффект вакцинного штамма *M. bovis* BCG в отношении макрофага, способствующий презентации антигенов по пути МНС I (процессируются иммунопротеасомой) и ингибирующий эффект вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv.

Ключевые слова: иммунопротеасома, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, макрофаги.

To study the effect of *M. bovis* BCG vaccine strain and virulent laboratory *M. tuberculosis* H37Rv strain on the expression of macrophage-inducible immunoproteasome subunits, a real-time reverse-transcription polymerase chain reaction technique using cDNA obtained with mRNA was employed to investigate gene expression. The results of infection were taken into account on days 1, 2, and 3 of inoculation.

There was a difference in the time course of changes in *lmp7* expression, which consisted in reducing the number of transcripts on day 3 after infection with the virulent *M. tuberculosis* strain versus the vaccine one. It was assumed that the inhibited transcription of this subunit, when inoculated with the virulent *M. tuberculosis* strain, might lead to the blocked assembly of the whole immunoproteasome and to its reduced functional activity.

The investigation showed the stimulating effect of the *M. bovis* BCG vaccine strain against the macrophage that contributed to the presentation of major histocompatibility complex class I antigens (processed by the immunoproteasome) and the inhibitory effect of the virulent *M. tuberculosis* H37Rv strain.

Key words: immunoproteasome, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, macrophages.

Деградация подавляющего большинства (80-90%) внутриклеточных белков в эукариотических клетках осуществляется протеасомой. Протеасома состоит из двух основных субкомплексов: коровой 20S протеасомы, содержащей протеазные субъединицы, и активатора PA700 или 19S регуляторной частицы. Помимо конститутивной 20S протеасомы, у млекопитающих существует иммунопротеасома, сборка которой начинается после попадания в клетку чужеродных антигенов. Происходит индукция синтеза трех дополнительных протеасомных субъединиц $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) и $\beta 5i$ (LMP7), которые во время сборки протеасомы встраиваются вместо конститутивных субъединиц $\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$. Иммунопротеасома генерирует пептиды, которые в последующем используются в презентации антигена [2].

Широко представлены работы, описывающие формирование иммунопротеасомы при вирусных заболеваниях, таких как грипп [5, 7, 8], гепатит В [9] и ВИЧ [10]. Существуют также работы, описывающие возникновение иммунопротеасомы в ответ на инфицирование патогенными грибами [3] и простейшими [4, 11]. Однако крайне мало исследований посвящено изучению формирования иммунопротеасомы при бактериальных инфекциях.

Цель исследования – изучение количества транскриптов генов индуцибельных субъединиц иммунопротеасомы LMP2, LMP7 и MECL1 в перитонеальных макрофагах (МФ) мыши, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и *Mycobacterium bovis* BCG.

* Обзор подготовлен при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-2857.2013.7.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием лабораторного вирулентного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и вакцинного штамма *M. bovis* BCG. Для заражения использовали суспензию одиночных клеток *M. tuberculosis*, стандартизованную по фазе роста [1]. МФ выделяли из перитонеального экссудата мышей линии C57Bl/6 [1]. Заражение осуществляли в соотношении 1МФ : 5 микобактерий.

Особенности синтеза иммунопротеасомы МФ в ответ на попадание в них микобактериальных штаммов (вакцинных или вирулентных) были оценены по количеству транскриптов генов, кодирующих индуцибельные субъединицы иммунопротеасомы.

Для анализа экспрессии генов использовали метод ПЦР в режиме реального времени с кДНК, полученной с мРНК в результате реакции обратной транскрипции. Реакцию проводили с использованием специфичных праймеров, подбор которых осуществлен с применением специализированного программного обеспечения и верифицирован с помощью биоинформационных инструментов-web-сервисов (NCBI BLAST, In silico PCR) (табл. 1).

Для зондов к мРНК всех исследованных генов были использованы пары флюорофор – гаситель FAM и BHQ1 соответственно.

Состав смеси для проведения ПЦР в реальном времени: смесь правого и левого праймеров 10 мкМ – 1 мкл; флуоресцентно меченный зонд – 0,5 мкл; 25 мМ MgCl – 2 мкл; 10-кратный реакционный буфер – 2,5 мкл; смесь дНТФ 10 мкМ – 0,5 мкл; кДНК – 5 мкл; Taq-полимераза – 0,5 мкл (активность – 1 единица); вода – 13 мкл. Условия проведения ПЦР в реальном времени: денатурация – 15 с 94°C, отжиг праймеров и элонгация – 1 мин 60°C, количество циклов – 55.

Определение количества транскриптов каждого гена осуществляли относительно транскриптов гена домашнего хозяйства – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – *GAPDH*, т. к. известно, что вне зависимости от функционального состояния клетки количество транскриптов данного гена находится на одном и том же уровне.

Подсчет относительного количества транскриптов для всех генов проводили по формуле:

$$\frac{N}{N(gapdh)} = 2^{(x(gapdh)-x)}$$

где: N – число копий мРНК, синтезированной с исследуемого гена;

N(*gapdh*) – число копий мРНК, синтезированной с гена домашнего хозяйства *gapdh*;

x – значение порогового цикла при амплификации исследуемого гена;

x(*gapdh*) – значение порогового цикла гена домашнего хозяйства *gapdh*.

Уровень экспрессии гена выражали в относительных единицах (ОЕ) по отношению к экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*.

Экспрессию генов, кодирующих индуцибельные субъединицы иммунопротеасомы, изучали на 1-е, 2-е и 3-и сут после инфицирования.

Результаты

Результаты определения относительного количества транскриптов генов *Imp2*, *Imp7* и *mecl1* методом ПЦР в режиме реального времени представлены в табл. 2.

Показано, что в интактных МФ относительный уровень экспрессии генов *Imp-2*, *Imp-7* и *mecl-1* с учетом стандартного отклонения от среднего и не превышал 0,5 ОЕ. Относительное количество транскриптов всех исследованных генов в МФ, зараженных как вакцинным, так и вирулентным штаммом микобактерий, на протяжении всего срока эксперимента было достоверно выше, чем в интактных МФ на все сроки исследования.

Для анализа динамики изменения относительного количества транскриптов генов, кодирующих индуцибельные субъединицы иммунопротеасомы, на каждый срок было вычислено отношение уровня экспрессии изучаемых генов зараженных МФ к уровню экспрессии тех же генов в интактных МФ. Результаты представлены на рисунке.

Как видно из рисунка, при однократном заражении *M. bovis* BCG уровень экспрессии гена *Imp2* в 1-е сут после заражения в 12,39 раза превышал уровень экспрессии интактных МФ, на

Таблица 1

Последовательности праймеров и зондов для проведения ПЦР в реальном времени для анализа экспрессии генов *Imp2*, *Imp7*, *mecl1*

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	TaqMan зонд
<i>Imp2</i>	GGATGAACAAAGTGATCGAGATTAAC	GATAATACAACCCCTGCACTCCTTG	TCGGCTGCAC AACCAG ACATGGT
<i>Imp7</i>	GTTTCACACAGATGCCATCAC	CCCAGGATGACTCGATGGTC	CCCACTAGAGCCATCTCGGTTTCATG
<i>mecl1</i>	CGAGCCTGTGCAGAGAGCT	CACAGTTTCCTCAAGAAGTTCCA	CTGGAACCAACACCTGTCCTGACCC

Относительное количество транскриптов генов, кодирующих индуцибельные субъединицы иммунопротеасомы на 1, 2 и 3-й дни после заражения

Параметры	Imp2						Imp7						mec11					
	1-й день		2-й день		3-й день		1-й день		2-й день		3-й день		1-й день		2-й день		3-й день	
	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО	Ср.	СО
BCG	4,01	0,28	8,12	1,68	2,63	0,62	1,00	0,07	4,20	0,44	2,32	0,41	2,13	0,44	8,59	0,59	2,60	0,44
H37Rv	2,70	0,11	5,42	0,58	1,55	0,39	0,99	0,17	3,94	0,58	1,19	0,24	1,89	0,33	9,01	0,94	2,60	0,39
МФ	0,32	0,08	0,38	0,03	0,33	0,07	0,31	0,03	0,37	0,06	0,40	0,06	0,49	0,07	0,53	0,05	0,54	0,10

Примечание: Ср. – среднее значение из трех наблюдений, СО – стандартное отклонение, BCG – МФ, инфицированные *M. bovis* BCG, H37Rv – МФ, инфицированные *M. tuberculosis* H37Rv, МФ – интактные МФ.

2-е сут уровень экспрессии достоверно увеличился, достигая максимума, и превышал уровень экспрессии в интактных МФ в 21,38 раза. На 3-и сут был зафиксирован минимальный уровень экспрессии *Imp2*, в 8,03 раза превышающий экспрессию в интактных МФ. Значения экспрессии гена во все временные точки достоверно отличались друг от друга.

Сходная динамика изменения уровня экспрессии гена *Imp2* наблюдалась и при заражении *M. tuberculosis* H37Rv: количество относитель-

ного числа транскриптов в каждую временную точку достоверно отличалось друг от друга, максимум экспрессии был зафиксирован через 2 сут после заражения, а минимум – через 3 сут. Уровень экспрессии гена через сутки после заражения в 8,35 раза, на 2-е сут в 14,20 раза и на 3-и сут в 4,72 раза превышал экспрессию этого гена в интактных МФ.

Изучение динамики экспрессии гена *Imp7* показало, что после заражения *M. bovis* BCG наименьший уровень экспрессии гена наблюдался на 1-е сут

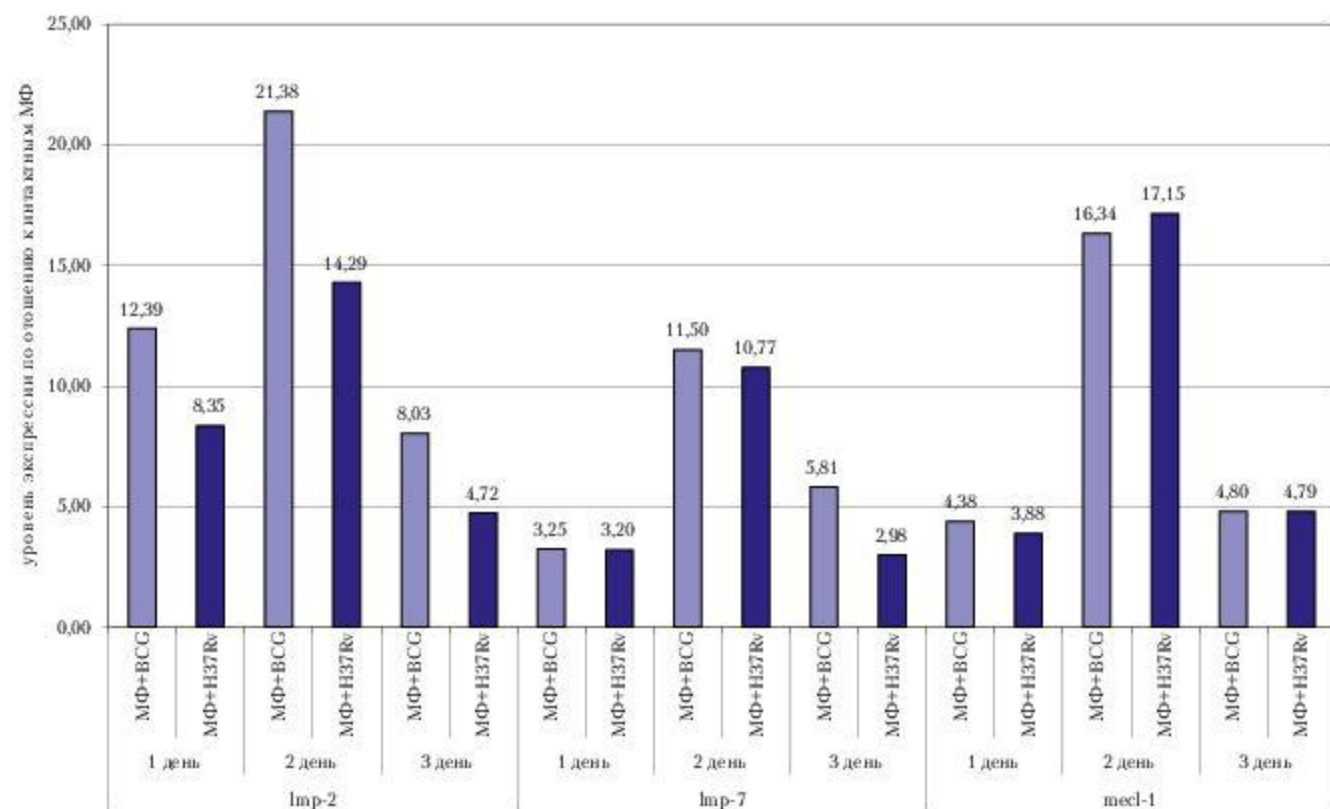


Рис. Уровень экспрессии генов, кодирующих индуцибельные субъединицы иммунопротеасомы, в МФ, инфицированных *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv, по отношению к уровню экспрессии в интактных МФ

эксперимента (в 3,25 раза выше, чем в интактных МФ), ко 2-м сут достигал наибольшего значения экспрессии – в 11,50 раза выше, чем в интактных, а к 3-му дню экспрессия достоверно снижалась по отношению ко 2-му дню, но была достоверно выше, чем в 1-й день и в 5,81 раза превышала экспрессию этого гена в интактных МФ.

При инфицировании H37Rv наблюдали следующую динамику экспрессии *Imp7* – в 1-й день уровень экспрессии в 3,20 раза превышал уровень экспрессии этого гена в интактных МФ, ко 2-му дню экспрессия увеличивалась и превышала уровень экспрессии в интактных МФ в 10,77 раза. К 3-му дню происходило снижение экспрессии до уровня 1-го дня.

Уровень экспрессии *mecl1* в первый день после заражения *M. bovis* BCG в 4,38 раза превышал уровень экспрессии в интактных МФ, ко 2-му дню увеличивался до 16,34 раз и к 3-му дню снижался до уровня первого дня. Сходная динамика наблюдалась и при заражении *M. tuberculosis* H37Rv – в 1-й день уровень экспрессии гена превышал экспрессию в интактных МФ на 3,88 раза, во 2-й – в 17,15 раз и в 3-й день – в 4,79 раз.

Таким образом, при однократном заражении МФ штаммами *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv было показано, что уровень экспрессии всех изученных генов в инфицированных МФ превышал экспрессию этих генов в интактных МФ как минимум в 3 раза. Для всех иммуносубъединиц максимум экспрессии регистрировался ко 2-му дню после заражения.

Уровень экспрессии в МФ *Imp2* на 1-е, 2-е и 3-и сут после заражения *M. bovis* BCG был достоверно выше, чем после инфицирования *M. tuberculosis* H37Rv.

Уровень экспрессии *Imp7* после заражения *M. bovis* BCG и *M. tuberculosis* H37Rv на 1-й и 2-й день после заражения не отличался, а через 3 сут после заражения *M. bovis* BCG был достоверно выше, чем после заражения *M. tuberculosis* H37Rv.

Количество транскриптов *mecl1* не отличалось между МФ, инфицированными вакцинным или вирулентным штаммами, во все сроки исследования.

Заключение

Изучение уровня экспрессии субъединиц иммунопротеасомы перитонеальными МФ мыши при заражении вакцинным штаммом *M. bovis* BCG и вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv показало индукцию транскрипции генов иммуносубъединиц. Показана одинаковая динамика экспрессии индуцибельных субъединиц *Imp2* и *mecl1* вне зависимости от инфицирующего агента (повышение ко 2-му дню и снижение к 3-му дню), однако при инфицировании *M. bovis* BCG уро-

вень экспрессии *Imp2* был достоверно выше, чем при заражении *M. tuberculosis* H37Rv.

Также была выявлена разница в динамике экспрессии субъединицы *Imp7*. На 3-и сут после заражения ее уровень при инфицировании *M. bovis* BCG был достоверно выше (превышение базового уровня в 6 раз), чем при заражении *M. tuberculosis* H37Rv (превышение базового уровня в 3 раза).

Известно, что субъединица LMP7 поддерживает кинетику формирования иммунопротеасом, а также участвует в созревании протеазных субъединиц: она необходима для удаления N-концевого лидерного пептида, позволяя освободить активные сайты субъединиц LMP2 и MECL1 [12]. Поэтому ингибирование транскрипции этой субъединицы при заражении вирулентным штаммом МБТ может вести к блокированию сборки всей иммунопротеасомы и к снижению ее функциональной активности.

Показанное снижение количества транскриптов субъединицы LMP7 на 3-и сут. после инфицирования вирулентным штаммом *M. tuberculosis* H37Rv согласуется с работой, описывающей снижение LMP7 на уровне мРНК при заражении дендритных клеток вирусом простого герпеса. Сделали вывод, который может быть справедливым и в отношении микобактерий, что снижение уровня LMP7-мРНК может играть биологически важную роль, так как благодаря этому вирус может избегать распознавания иммунной системой хозяина, вследствие чего переходит в латентное состояние [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреевская С. Н., Чернушова Л. Н., Смирнова Т. Г. и др. Изучение ex vivo роста в макрофагах штаммов *Mycobacterium tuberculosis* разных генотипических кластеров // Пробл. туб. – 2006. – № 12. – С. 43-48.
2. Сорокин А. В., Ким Е. Р., Овчинников Л. П. Протеасомная система деградации и процессинга белков // Успехи биол. химии. – 2009. – Т. 49. – С. 3-76.
3. Barton L. E., Cruz M., Rangwala R. et al. Regulation of immunoproteasome subunit expression in vivo following pathogenic fungal infection // J. Immunol. – 2002. – Vol. 169, № 6. – P. 3046-3052.
4. Chou B., Hissada H., Shen J. et al. Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein // Microbes Infect. – 2008. – Vol. 10, № 3. – P. 241-250.
5. de M. Jayarapu K., Elenich L., Monaco J. J. et al. Beta 2 subunit propeptides influence cooperative proteasome assembly // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, № 8. – P. 6153-6159.
6. Eisemann J., Prechtel A. T., Mhl-Zrhies P. et al. Herpes simplex virus type 1 infection of mature dendritic cells leads to reduced LMP7-mRNA-expression levels // Immunobiology. – 2009. – Vol. 214, № 9-10. – P. 861-867.

7. Mangano E. N., Hayley S. Inflammatory priming of the substantia nigra influences the impact of later paraquat exposure: Neuroimmune sensitization of neurodegeneration // *Neurobiol. Aging*. – 2009. – Vol. 30, № 9. – P. 1361-1378.

8. Pang K. C., Sanders M. T., Monaco J. J. et al. Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8⁺ T cell responses // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177, № 11. – P. 7680-7688.

9. Robek M. D., Garcia M. L., Boyd B. S. et al. Role of immunoproteasome catalytic subunits in the immune response to hepatitis B virus // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81, № 2. – P. 483-491.

10. Steers N. J., Peachman K. K., McClain S. R. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Gag p24 alters the composition of immunoproteasomes and affects antigen presentation // *J. Virol.* – 2009. – Vol. 83, № 14. – P. 7049-7061.

11. Tu L., Moriya C., Imai T. et al. Critical role for the immunoproteasome subunit LMP7 in the resistance of mice to

Toxoplasma gondii infection // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39, № 12. – P. 3385-3394.

12. Van den Eynde B. J., Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome // *Curr. Opin. Immunol.* – 2001. – Vol. 13, № 2. – P. 147-153.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Андреевская Софья Николаевна

ФГБУ «Центральный НИИ туберкулеза» РАМН,
кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник,
отдел микробиологии.

107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел. 8 (499) 785-90-91.

E-mail andsofia@mail.ru

Поступила 9.12.2013

ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

«СОВРЕМЕННЫЙ ПОДХОД К ПРОФИЛАКТИКЕ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ТУБЕРКУЛЕЗА С МНОЖЕСТВЕННОЙ И ШИРОКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ ВОЗБУДИТЕЛЯ»

**29 – 30 мая 2014 г.
Москва**

ГК "ИЗМАЙЛОВО" корпус "Альфа",
3-й этаж, КОНГРЕСС-ЦЕНТР



Организаторы: РОССИЙСКОЕ ОБЩЕСТВО ФТИЗИАТРОВ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ТУБЕРКУЛЕЗА РАМН