

На правах рукописи

Илюха Владимир Викторович

**УЧАСТИЕ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ *CFLAR* И *TMEM173* В ПРОГРАММИРОВАННОЙ
КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ У МЫШЕЙ ЛИНИЙ C57BL/6 И MSM,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ЕЁ АКТИВАТОРАМ**

03. 01. 04 – Биохимия

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования
«Петрозаводский государственный университет»

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Полторак Александр Николаевич

Официальные оппоненты:

Петренко Александр Георгиевич - доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», лаборатория клеточной биологии рецепторов, руководитель.

Барлев Николай Анатольевич - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии РАН», лаборатория регуляции экспрессии генов, заведующий.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской Академии Наук», г. Санкт-Петербург.

Защита состоится: « » 2020 г. в часов на заседании диссертационного совета Д001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении: «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») (1973764, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ») по адресу 1973764, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения: «Институт экспериментальной медицины» (ФГБНУ «ИЭМ») по адресу: 1973764, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12, ФГБНУ «ИЭМ» и на сайте: <https://iemspsb.ru/soiskatel-kand03/iliuha-vv/>

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

Доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время известно, что программируемая клеточная смерть имеет решающее значение для поддержания гомеостаза организма, а сбои, возникающие при реализации ее механизмов, часто приводят к самым серьезным последствиям (Манских, 2007). В живом организме ежедневно в силу различных причин (среди которых - освобождение от выполнивших свою задачу, измененных и поврежденных клеток; процессы регенерации организма; механические повреждения и другие) элиминируется большое количество клеток (Thomas, Franklin-Tong, 2004). Особую роль программируемая клеточная смерть играет в реализации функций иммунной системы, в частности, в процессах селекции Т-клеток. В ходе позитивной селекции элиминируются клетки, не способные взаимодействовать с молекулами МНС (главный комплекс гистосовместимости от англ. Major histocompatibility complex), а значит, не способные выполнять свои функции. В результате негативной селекции отсеиваются активно взаимодействующие с собственными антигенами клетки. В обоих случаях уничтожение клеток идет путем апоптоза. При нарушении данного пути появляются Т-клетки, способные самоактивироваться, что является причиной развития аутоиммунных заболеваний (Chen, Lai 2009). Актуальная проблема злокачественного перерождения клетки также тесно связана с нарушением процессов программируемой клеточной смерти (Ярилин, 2003).

Кроме того, клеточная смерть является важной составляющей системного иммунного ответа на инфекцию. Например, макрофаги и дендритные клетки, встречающие патоген первыми среди клеток иммунной системы, могут запускать воспалительный ответ. Его целью является активация других клеток иммунной системы, в частности, нейтрофилов, специализирующихся в фагоцитозе, для борьбы с патогеном. Альтернативным вариантом развития событий, хотя и негативным для клетки, но очень важным для организма на системном уровне, является программируемая клеточная смерть. Это сочетание очевидно при понимании функций клеточной смерти, так как препятствует размножению и распространению патогена по всему организму. В то же время возможность ликвидации патогена является весьма важным приобретением для организма как сложной, многоуровневой системы (Murphy, Weaver, 2016).

Степень разработанности темы. Изучению биохимических механизмов реализации клеточной смерти посвящено большое количество работ (Dhanasekaran, Reddy, 2017; Jorgensen, Rayamajhi, Miao, 2017; Shi, Gao, Shao, 2017; Fuchs, Steller, 2015; Tower, 2015; VanHautegeem et al., 2015). Тем не менее, остается актуальным ряд вопросов, связанных с этим значимым клеточным процессом: в частности, влияние мутаций в про- и антиапоптотических генах на его течение; различия в активационных механизмах *in vivo* в зависимости от микро- и макроокружения и ряд других. В последние годы сформировалось новое направление в изучении проблемы клеточной смерти, посвященное исследованию роли молекулярных сенсоров цитозольной ДНК вирусного и бактериального происхождения, в том числе IFI16 - STING – cGAS (IFI16 – гамма-интерферон-индуцибельный протеин 16 от англ. gamma-interferon-inducible protein, STING – стимулятор интерфероновых генов от англ. Stimulator of interferon genes, cGAS - цикло-АМФ-ГМФ синтаза от англ. cyclic GMP-AMP synthase), в данном процессе (Almineetal., 2017). Считается, что они могут выполнять функцию ключевых биохимических молекул, участвующих на самых ранних этапах индукции клеточной смерти. Белковые продукты генов *Tmem173* (трансмембранный протеин 173 от англ. transmembrane protein 173 -, белок STING) и *cFlar* (каспаза 8 и FADD подобный регулятор апоптоза от англ. Caspase 8 And FADD Like Apoptosis Regulator) активно вовлекаются в процессы, связанные с программируемой клеточной смертью, а полиморфные формы указанных генов, представленные, в частности, у мышей линий C57BL/6 и MSM, могут оказывать большое влияние на их течение (Larkin B. et al., 2017, Ram D.R. et al., 2016). Подобные исследования являются актуальными, поскольку полученные результаты вносят вклад в направление разработки таргетных лекарственных препаратов для иммунотерапии.

Цель работы - сравнительное изучение влияния продуктов генов *cFlar* и *Tmem173* на программированную клеточную гибель у мышей линий C57BL/6 и MSM, различающихся по устойчивости к смерти, индуцированной агонистами Fas/CD95.

Задачи исследования:

1. Идентифицировать локусы гена *cFlar*, вызывающие устойчивость мышей линии MSM к программированной клеточной смерти, опосредованной через рецептор Fas/CD95.
2. Провести сравнительный анализ экспрессии гена *cFlar* и охарактеризовать биологическую роль белка cFLIP в клетках печени мышей линий MSM и C57BL/6.
3. Исследовать влияние полиморфизмов гена *cFlar* на экспрессию сплайс-изоформ cFLIP_L и cFLIP_R в гепатоцитах мышей линии MSM и вклад данных белковых продуктов в устойчивость к Fas/CD95-индуцированной смерти.
4. Изучить сигнальные пути, активируемые в ответ на стимуляцию *Tmem173*/STING, в Т-клетках мышей линии C57BL/6; охарактеризовать механизм программированной клеточной гибели с участием STING.

Научная новизна. Впервые в области пятого экзона гена *cFlar* идентифицирована инсерция в 21 п.н., влияющая на альтернативный сплайсинг мРНК cFLIP. Данная область является 3'-UTR (3'-нетранслируемая область от англ. 3'-untranslated region) для cFLIP_R и интронной для cFLIP_L, обуславливает высокое содержание сплайс-изоформы cFLIP_L в печени мышей, устойчивых к Fas/CD95-зависимой смерти (линия MSM, FAS – фактор апоптотического семейства (от англ. factor apoptosis superfamily)), за счет преимущественного образования мРНК cFLIP_L вследствие альтернативного сплайсинга.

Впервые обнаружено, что по аналогии с клетками врожденного иммунитета в Т-клетках STING-опосредованный сигнальный путь индуцирует ответ IFN типа I, что является доказательством функционирования PRR (pathogen recognition receptors, патоген распознающие рецепторы) в Т-клетках, однако активация ТКР (T-cellreceptor, Т-клеточный рецептор) приводит к ответу, не являющемуся взаимозависимым от STING агонистов.

Впервые продемонстрирована ранее не описанная для Т-клеток STING-зависимая индукция реакции на белки, не прошедшие фолдинг (UPR-реакции, unfolded protein response), с последующей программированной гибелью Т-клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные о влиянии белковых продуктов генов *cFlar* и *Tmem173* на программируемую

клеточную смерть расширяют существующие представления о механизмах и стратегиях адаптаций организмов к различным условиям существования, а также позволяют глубже понять механизмы регуляции процессов программируемой клеточной смерти. Активация Т-клеток агонистами STING раскрывает их потенциал как перспективных иммунотерапевтических и/или противовирусных агентов, использование которых возможно в медицине. Важно также их использование как адъювантов вакцин с целью индукции интерферонового ответа.

Материалы диссертации могут быть использованы в лекционных курсах по биохимии и иммунологии для студентов биологических и медицинских специальностей вузов и колледжей, для написания учебных пособий, а также монографической литературы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Устойчивость мышей линии MSM к активации программируемой клеточной смерти, опосредованной через рецептор Fas/CD95, обусловлена соотношением сплайс-изоформ cFLIP_L и cFLIP_R в печени: относительное количество изоформы cFLIP_L в данном органе выше, чем изоформы cFLIP_R.

2. Высокое содержание изоформы cFLIP_L в печени мышей линии MSM обусловлено инсерцией в 21 п.н. в 3'-UTR области пятого экзона гена *cFlar*, способствующей преимущественному образованию в результате альтернативного сплайсинга cFLIP_L мРНК.

3. Изоформа cFLIP_L в гепатоцитах мышей линии MSM связывает каспазу 8 и предотвращает ее расщепление до p10/18, что необходимо для запуска Fas/CD95-индуцированной клеточной смерти.

4. Стимуляция Т-клеток синтетическим STING-агонистом 5,6-диметилксантенон 4 уксусной кислотой (DMXAA) приводит к индукции экспрессии интерферон-стимулирующих генов (ISGs), синтезу интерферонов I и II типа (IFN-β, IFN-γ, соответственно) и активации программируемой клеточной смерти (апоптоза).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на региональных, всероссийских и международных конференциях: 15th International Congress of Immunology (Милан, 2013); Immunology&Cancer 2014 (Нижний Новгород, 2014); Science of the Future (Санкт-Петербург, 2014); 3rd Annual Meeting

of the International-Cytokine-and-Interferon-Society (Bamberg, Germany, 2015); Высокопроизводительное секвенирование в геномике (Новосибирск, 2017); 15-ой и 16-ой Международных молодежных научно-практических конференциях «Фундаментальные исследования, методы и алгоритмы прикладной математики в технике, медицине и экономике» (Новочеркасск, 2017); 5th Annual Meeting of the International-Cytokine-and-Interferon-Society (Kanazawa, Japan, 2017) .

Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета Института биологии, экологии и агротехнологий ПетрГУ, а также на научном семинаре Лаборатории молекулярной генетики врожденного иммунитета Института высоких биомедицинских технологий ПетрГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и 3 тезисов докладов.

Достоверность полученных результатов подтверждается наличием репрезентативной выборки объектов, адекватной целям и задачам исследования, проведенного с помощью современных методов; большим объемом фактического материала, который обработан с использованием традиционных методов статистики, применяемых в биологических исследованиях; публикацией результатов работы в рецензируемых журналах и представлением докладов на региональных, всероссийских, и международных конференциях.

Личный вклад автора в работу включает участие в разработке идей, последовательное планирование и постановку комплексных экспериментов, обработку и анализ данных, участие в написании научных статей. В разных совместных публикациях вклад автора составил от 20 до 95%.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, содержит 53 рисунка. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 6 разделов результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, который включает 249 наименований, из них 242 работы на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы изложены современные представления о программируемой клеточной смерти. Рассмотрены физиологические и

биохимические механизмы регуляции, а также молекулярно-генетические механизмы генерации элиминационных процессов. Представлены биохимические механизмы взаимосвязи генов *cFlar* и *Tmem173* и процессов программируемой клеточной смерти. Обозначены нерешенные вопросы и перспективы исследования роли белковых продуктов генов *cFlar* и *Tmem173* в механизмах программируемой клеточной смерти.

Материалы и методы

Экспериментальными животными были мыши линий C57BL/6, MSM дикого типа, а также IFNAR-/- и STING-/-. Для изучения устойчивости к Jo2 (моноклональные антитела, агонисты FASR, по авт. J.Ogasawara) *in vivo*, производились инъекции через хвостовую вену в количестве 10 мкг или 2,4 мкг MegaFasL (Multimetric Fas-Ligand). Введение конструкта, имитирующего участок гена *Cflar*, проводилось аналогично. Конструкт синтезировался с использованием набора ExontrapKit (MoBiTec, Germany) согласно инструкции производителя.

Все эксперименты с животными проводились с соблюдением Международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным (последняя редакция 2013 г.), принципов гуманности, изложенных в директиве Европейского Сообщества (86/609 ЕЭС от 24 ноября 1986 г.), правил надлежащей лабораторной практики в Российской Федерации (GLP) (утв. Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. №708н). Образцы клеток и тканей у исследуемых животных отбирали после усыпления в среде CO₂.

Выделение клеток из различных тканей и органов, их подсчет и активация. Перитонеальные макрофаги и клетки костного мозга выделялись по стандартной методике и культивировались в средах ДМЕМ (Дубеко модифицированная Иглум от англ. DMEM) и RPMI (от англ. Roswell Park Memorial Institute) соответственно.

CD3⁺, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, были выделены из селезенки, тимуса и периферических лимфатических узлов с использованием наборов Easy Sep (STEMCELL Technologies, Канада), согласно инструкциям производителя. Активированные Т-клетки получали добавлением активирующих CD3/CD28 Dynabeads (ThermoFisherScientific, США) в присутствии 50 ед/мл рекомбинантного

IL-2. Мышиные эмбриональные фибробласты выделялись с использованием Pierce Mouse Embryonic Fibroblast Isolation Kit (Invitrogen, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Активация макрофагов в эксперименте проводилась добавлением DMXAA (Sigma Aldrich, США) от 2,5 до 10 мкг/мл в течение 4, 12 или 24 часов. Для активации ТКР добавляли 3 мкг/мл анти-CD3 и анти-CD28 (Abcam, Великобритания) на 12 часов. Ингибиторы программируемой клеточной смерти Z-VAD (OMe)-FMK (Bachem, Швейцария) и Necrostatin1 (Sigma Aldrich, США) добавлялись в среду до концентраций 50 мкМ и 30 мкМ соответственно.

Т-клетки для эксперимента стимулировались добавлением DMXAA от 2,5 до 10 мкг/мл в течение 4, 12 или 24 часов. Для активации ТКР (Т-клеточных рецепторов) добавляли 3 мкг/мл анти-CD3 и анти-CD28 на 12 часов. R's'scGAMP (Invivogen, США), в случае его использования, добавлялся в среду инкубирования клеток до концентрации 4 мкг/мл. Ингибиторы программируемой клеточной смерти Z-VAD (OMe)-FMK (Bachem, Швейцария) и Necrostatin1 (SigmaAldrich, США) добавлялись в среду до концентраций 50 мкМ и 30 мкМ соответственно.

Для определения пролиферации Т-клеток использовали подход флуоресцентной метки (CFSE). Для определения дифференцировки клеток к ним добавляли антитела (eBioscience, США), согласно инструкциям производителя. Для определения выживаемости клеток использовали раствор йодистого пропидия конечной концентрацией 10 мкг/мл (LifeTechnologies, США). Подсчет производили в 96-луночном планшете на приборе TECAN Infinite 200 Pro (TECAN, Швейцария).

Электронные микрофотографии делали на базе главного медицинского центра Тафтс (Бостон, США) с использованием системы Leica SP8 (Германия).

Выделение тотальной клеточной РНК проводили с помощью «РНК-Экстран» («Синтол», Москва) согласно инструкции производителя. Качество и концентрацию полученной РНК определяли на Fragment Analyzer (Advanced Analytical, США).

Для удаления возможной примеси геномной ДНК образцы обрабатывали ДНК-азой I («Fermentas», Литва) в соответствии с протоколом, рекомендуемым производителем. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реактивов фирмы «Синтол» (Москва).

Для секвенирования транскриптома образцы тотальной РНК подготавливали с помощью наборов TruSeqStranded RNA LT Kit (Illumina, США), согласно инструкции предлагаемой фирмой производителем. Секвенирование проводили на MiSeq (Illumina, США). Секвенс производился с использованием реагентов с длиной прочтения 2*75 нуклеотидов. Полученные результаты обрабатывались с помощью программного обеспечения TopHat2 (Trapnell et al., 2010; Trapnell, Pachter, Salzberg, 2009). Данные секвенирования находятся в свободном доступе в базе данных GEO Omnibus под номерами GSE89361 и GSE72454.

Реакцию ПЦР в режиме «реального времени» проводили с помощью прибора «Step One Plus» (AppliedBiosystems, США) и интегрированного программного обеспечения в присутствии SYBRGreen («Синтол», Москва). Синтез олигонуклеотидов был осуществлен компанией «New England Biolabs» (США). Методика проводилась согласно рекомендациям производителей. Детекция интенсивности флуоресцентного сигнала осуществлялась на этапе отжига/элонгации. Все результаты нормализовывались относительно значений экспрессии гена GAPDH.

Иммуноблотинг проводился на градиентном полиакриламидном геле по Лемли (1970). Затем образы переносились на нитроцеллюлозную мембрану и связывались с первичными антителами, после чего с ними связывались вторичные, флуоресцирующие антитела (Cell Signaling, США). Флуоресценцию определяли на приборе SpectraMaxI3 (Molecular Devices, США). Содержание цитокинов в супернатанте определяли с помощью наборов для иммуноферментного анализа DuoSet ELISA (R&D Systems, США) согласно инструкциям. Флуоресценцию определяли на приборе SpectraMaxI3 (Molecular Devices, США).

Определение активности аланинаминотрансферазы(АЛТ) проводили по методу Райтмана-Френкеля с использованием набора реактивов Трансаминаза-АЛТ-Ново (Вектор-бест, Москва) согласно рекомендациям производителя.

Трансфекция. Для пересадки клеток, были выделены CD3+ Т-клетки из мышей линии C57BL/6. Эти клетки экспрессируют CD45.1. После культивации *in vitro* около 8 миллионов клеток было введено STING +/- мышам, чьи клетки экспрессируют CD45.2. Через 12 часов после инъекции DMXAA в хвостовую вену,

CD3⁺ Т-клетки вновь были выделены и разделены на CD45.1 и CD45.2 методом FACS (Fluorescenceactivatedcellsorting) на FACS Aria (BD Biosciences, США) с использованием реактивов и стандартных процедур, рекомендуемых производителем, для последующего выделения РНК.

Статистическая обработка результатов исследования велась с использованием пакетов статистических программ MS Excel и Statgraphics общепринятыми методами вариационной статистики, программой статистической обработки и графического дизайна PRISM 7 (Graph Pad Software). Сравнение проводили, используя непараметрический критерий (U) Вилкоксона-Манна-Уитни, кластерный анализ (метод ближайшего соседа), метод логарифмических рангов и метод количественно связанных локусов. Для оценки степени влияния факторов использовали дисперсионный анализ (Коросов, Горбач, 2010). Для оценки вовлечения сигнальных путей в ответ клеток на различные стимулы использовали программное обеспечение баз данных PANTHER и QiagenSABiosciences. Количественную оценку вовлечения сигнальных путей проводили с использованием метода Oncofinder (Buzdin et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Влияние активации CD95 на мышей линий C57BL/6 и MSM различными агонистами

Мыши MSM оказались нечувствительны к индуцированной Jo2 смерти, а гибриды первого поколения, как и вторая родительская линия C57BL/6 уязвимы для действия вещества. Литературные данные и выявленный нами уровень АЛТ крови позволили предположить наличие поражения печени животных (Tunon et al., 2009).

Данные об активации каспазы 3 (Рис. 1) позволили показать, что поражение печени у мышей линии C57BL/6 обусловлено активацией апоптотических процессов.

Поскольку в клетках печени MSM аналогичных явлений не наблюдалось, можно утверждать, что они имеют специфическую устойчивость к апоптозу,

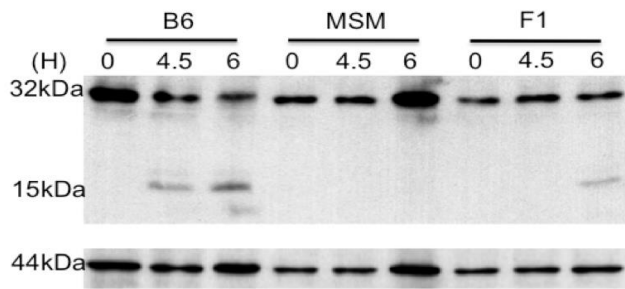


Рис. 1. Вестерн-блот активации каспазы 3 в печени при стимуляции Jo2 мышей линий C57BL/6, MSM и их гибридов в зависимости от времени после стимуляции. В качестве маркера контроля использовалась глутатионS-трансфераза (44кДа).

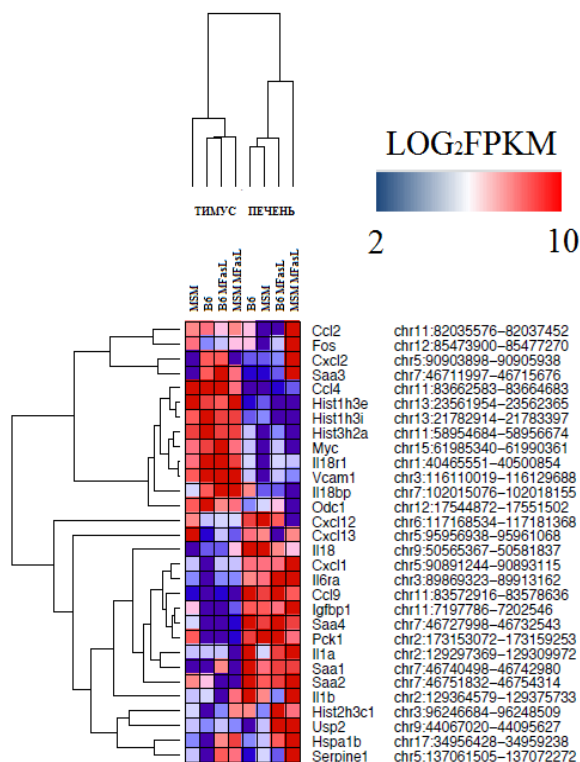


Рис. 2. Кладограмма и тепловая карта, показывающие разницу генетического профиля тимуса и печени мышей линий MSM и C57BL/6 до и после введения MegaFasL.

Данные получены с использованием программного обеспечения GenePattern

обусловленному Jo2. По особенностям запуска апоптотических процессов все клетки условно делят на две группы. Гепатоциты относятся к клеткам второго типа, что означает необходимость синергии митохондриального и CASP8 пути активации апоптоза для успешного его протекания (Jostetal., 2009; Krammer, Arnold, Lavrik, 2007).

Тимоциты относятся к первому типу, и поэтому менее требовательны к условиям активации CD95-зависимого апоптоза. В отличие от влияния на клетки печени, Jo2 оказывал существенный цитотоксический эффект на тимоциты как MSM, так и C57BL/6. Добавление ингибитора каспаз – zVAD, полностью блокировало влияние Jo2, что подтверждает факт элиминации клеток апоптотическим путем.

В ходе эксперимента устойчивость успешно преодолевается добавлением более сильного лиганда – MegaFasL. Эти данные согласуются с имеющейся информацией о его способности преодолевать устойчивость к экзогенному cFLIP в

зависимости от дозы (Fricker et al., 2010; Neuman et al., 2010).

Данные, полученные при изучении компонентов сигнальных путей программированной клеточной смерти, позволяют однозначно судить об активации апоптотического сигнального пути и блокировке некроптоза. Лигирование CD95 MegaFasL не оказывало особого эффекта на уровень экспрессии – он практически не менялся относительно уровня покоящихся клеток печени (Рис. 2). Тем не менее, ткани тимуса MSM и активированной MegaFasL печени MSM находятся на дистальных ветвях кладограммы, что подразумевает большие отличия генетического профиля при ответе на патогены в тканях мышей MSM. Полногеномный анализ всех стимулированных и не стимулированных образцов тканей показал существенные отличия тимуса MSM от других образцов по экспрессионному паттерну. Таким образом, устойчивость этой линии к апоптозу связана не столько с активацией CD95/Fas опосредованного сигналинга, сколько с процессами, прошедшими до его запуска.

2. Влияние полиморфизма локуса *cFlar* на кодируемый им белок

Количественный анализ сцепления позволил выявить несколько участков генома, способных оказывать влияние на выживаемость мышей при введении им Jo2. Данные секвенирования позволили остановиться на локусе *cFlar*, имеющем у мышей MSM инсерцию в 21 пару нуклеотидов (п.н.). Этот фрагмент оказался вовлеченным в альтернативный сплайсинг (Рис. 3). Для формы *cFLIP_R* он является 3'-концевым, а для *cFLIP_L* – интронным. Важнейшей особенностью данной инсерции является наличие предполагаемого места присоединения транскрипционного фактора U2. Таким образом, наличие инсерции у мышей MSM может являться моделью для изучения регуляции альтернативного сплайсинга в целом, и *cFLIP* в частности.

Используя данные секвенирования транскриптома изучаемых мышей, был показан преимущественный сплайсинг длинной формы *cFlip*, однако важно отметить, что это является специфичным для печени, так как в ткани тимуса подобных различий не наблюдалось.

Для окончательного подтверждения определяющей роли данной инсерции в преимущественном сплайсинге длинной формы, был создан конструкт,

захватывающий участок с полиморфизмом и фланговые последовательности (Rogaev et al., 2009). Использование плазмиды необходимо для исключения влияния сторонних факторов. Полученные данные позволяют с уверенностью утверждать, что преимущественный сплайсинг длинной формы cFLIP обеспечен инсерцией 21 п.н.

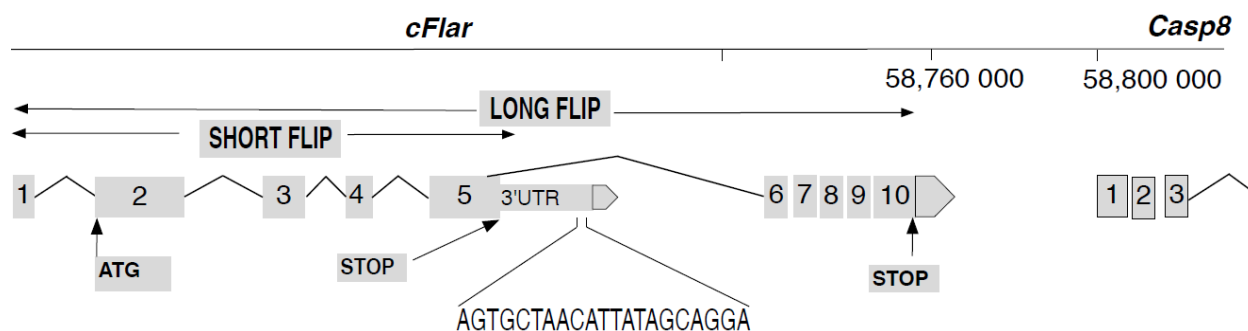


Рис. 3. Генетическая карта *cFlar*. Указана инсерция в 21 п. н.

3. Влияние полиморфизма *cFlar* на CASP8 и RIP1

При изучении изоформ каспазы 8 было показано, что содержание p55 и p43 является относительно близким у мышей C57BL/6, а мыши MSM демонстрируют наличие практически исключительно формы p43 (Рис. 4). Такое смещение между изоформами может наблюдаться в результате самостоятельного процессинга (Kallenberger et al., 2014) в связи с конститутивной активацией TNFR1, которая происходит при гетеродимеризации CASP8 и cFLIP_L.

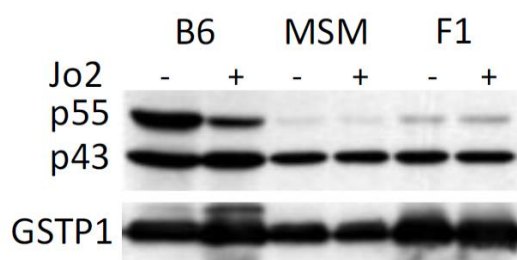


Рис. 4. Вестерн-блот анализ форм каспазы 8 в печени мышей при стимуляции 10мкг Jo2 интраперитонеально. Использовались линии C57BL/6, MSM и их гибриды 1-го поколения (F1).

Условные обозначения «+» и «-» - наличие и отсутствие стимуляции.

Одним из факторов, связанным с процессингом CASP8, являются уровни экспрессии изоформ cFLIP. Так, короткая связывается с прокаспазой 8 (p55 CASP8), оставляя последнюю интактной, до момента индукции рецептор-зависимой активации. Данные гетеродимеры более стабильны, чем гомодимеры p55, но не могут образовать проапоптотические тетрамеры p10/p18 до лигирования Fas-рецептора. Длинная форма cFLIP также

связывается с p55 CASP8, образуя энзиматически активные гетеродимеры, способные обрезать форму CASP8 p55 до p43 (Por et al., 2011) в процессе конститутивного, «текущего» сигналинга от рецепторов смерти, например TNFR-зависимой олигомеризации (Jiang et al., 1999).

Секвенирование РНК и данные qPCR показали близкие уровни мРНК фактора некроза опухоли в печени мышей C57BL/6 и MSM, что позволяет отбросить гипотезу о различном уровне влияния процессинга p55 CASP8 на этапе активации сигналинга. Длинная форма cFLIP не вовлечена в процессинг каспазы 8, однако является стабилизатором ее формы p43, образуя с ней гетеродимеры. При этом полученные данные определенно позволяют говорить о доминировании длинной формы cFLIP в клетках печени мышей MSM. Таким образом, относительно большое количество длинной формы cFLIP объясняет высокий уровень p43 CASP8, так же, как и компонентов некроптотического пути, в частности RIP1 (Dillon et al., 2012).

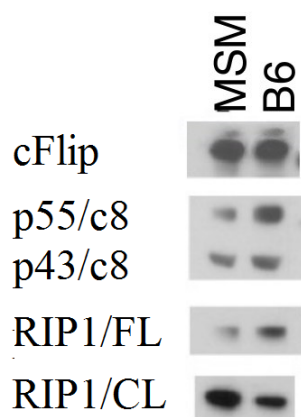


Рис. 5. Вестерн-блотт cFlip, изоформкаспазы 8 и RIP1 после иммунопреципитации печеночного лизата мышей линий MSM и C57BL/6.

Данные о соотношении форм cFLIP в печени не стимулированных мышей показали, что в комплексе с каспазой 8 в печени мышей линии C57BL/6 находятся обе формы cFLIP, а в печени мышей линии MSM длинная форма белка является доминирующей (Рис. 5). Более того, высокие уровни короткой формы RIP1, наблюдаемые в печени мышей MSM, относительно C57BL/6, также указывают на преимущественное формирование комплекса p43 CASP8/ cFLIP_L.

Исследования содержания изоформ белков CFLIP, CASP8 и RIP1 на конгенных мышах *cFlar*^{msm/msm}, выявили соответствие всех показателей родительской линии MSM. В частности, низкие уровни короткой формы cFLIP, p55 CASP8 и высокие уровни длинной формы cFLIP, если сравнивать с линией C57BL/6. Фрагментация RIP1 также протекала по типу MSM. Эти данные дают

основания утверждать, что различия в cFLIP, CASP8 и RIP1, обнаруженные в родительских линиях, обусловлены инсерцией в 21 п. н., которая вносит изменения в содержание изоформ cFLIP.

4. Влияние STING на синтез интерферонов

Для изучения влияния STING на продукцию интерферонов в Т-клетках в качестве активатора был выбран DMXAA. Это соединение является малой молекулой, при этом не является цДН (циклический динуклеотид), а также

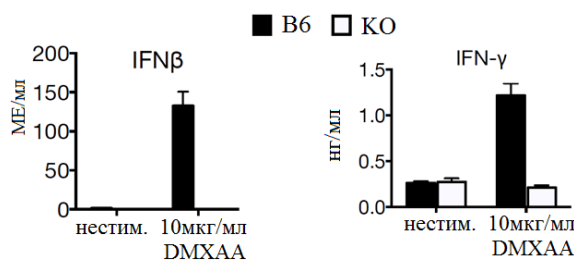


Рис. 6. Уровень синтеза IFN-β и IFN-γ в Т-клетках обычных и нокаутных по STING мышей при активации клеток DMXAA.

вызывает повышенный уровень экспрессии некоторых генов, связанных с регуляцией уровня IFN (IFIT1, IFIT2, MX2) как и R'S'cGAMP, тиол-модифицированный цДН. В клетках нокаутных по STING рост экспрессии этих генов, а в частности IFIT2, не наблюдается.

Кроме увеличения экспрессии ISGs наблюдался синтез IFN- β (Рис. 6). Эти данные нетипичны, так как, несмотря на то, что IFN-γ является основным цитокином Т-клеток, IFN типа I не характерен для них.

5. Влияние DMXAA на сигналинг в Т-клетках

Так же, как и в других клетках (Abe, Barber, 2014), воздействие DMXAA на Т-клетки мышей линии C57BL/6 приводило к фосфорилированию IRF3 и TBK1, чего не наблюдалось в случае нокаута STING.

В ходе исследования было установлено, что в отличие от макрофагов, аутокринный IFN не имеет влияния на сигналинг STING в Т-клетках, так как Т-клетки мышей, дефицитных по рецептору IFN типа 1, не отличались от нормальных мышей. Таким образом, при том, что активация STING в Т-клетках приводит к активации многих сигнальных путей, обнаруженных в клетках врожденного иммунного ответа, весьма вероятно наличие уникальных особенностей, которые могут выразиться в специфических реакциях Т-клеток.

В ходе эксперимента было изучено влияние лигандов TLR (толл-подобные рецепторы, от англ. Toll-like receptors) на Т-клетки, так как для их активации, как правило, требуется наличие предварительной или сочетанной стимуляции (Gelman

et al., 2004; Caron et al., 2005). В результате было обнаружено, что DMXAA усиливает STING зависимое фосфорилирование p-TBK1 и p-IRF3, а остальные элементы, связанные с MAPK и NFkB, перекрываются с явно аддитивным и, возможно, синергичным эффектом, что позволяет судить о наличии сочетанного влияния костимуляции STING и TLR. Кроме того, было показано наличие функционирующего сигналинга, низлежащего к ТКР в клетках STING^{-/-}, и не подвергающегося аддитивному эффекту при совокупной активации ТКР с DMXAA.

STING дефицитные и нормальные клетки мышей C57BL/6 демонстрируют сходные уровни p-ERK и p-p65 при стимуляции ТКР, что позволяет предположить отсутствие влияния STING на данные процессы. Инфекции *in vivo* и исследования иммунизации описывают отличающийся ответ в таких клетках, что относят к влиянию АПК и их взаимодействию с Т-клетками (Archer, Durack, Portnoy, 2014).

Данные о субпопуляциях Т-клеток нормальных и дефектных по STING мышей в совокупности с информацией об отсутствии разницы в ТКР сигналинге, позволяют предполагать, что Т-клетки мышей C57BL/6 в норме и мышей со STING^{-/-} функционально эквивалентны.

Все вышесказанное, в совокупности с данными о пролиферации Т-клеток при стимуляции ТКР и STING разделенной по времени, позволяет предполагать, что DMXAA не влияет на раннюю активацию Т-клеток, но способен инициировать STING-зависимый антипролиферативный сигналинг.

Полученные результаты секвенирования и RT-PCR наивных C57BL/6 и STING дефицитных CD3⁺ клеток показали, что DMXAA в чистом виде усиливает экспрессию группы ISGs у нормальных мышей, но не у дефицитных по STING (Рис. 7). Особенное внимание привлекает сильная up-регуляция целой группы генов интерферонов. Добавление стимуляторов ТКР совместно с DMXAA усиливало экспрессию ISGs, что укрепляет предположения о синергии этих путей.

Анализ полученных данных участия в сигнальных путях показал STING-зависимый скачок в путях апоптоза и каспазного каскада, а также снижение экспрессии IL-2 и генов клеточного цикла. Особенно примечательно то, что ни

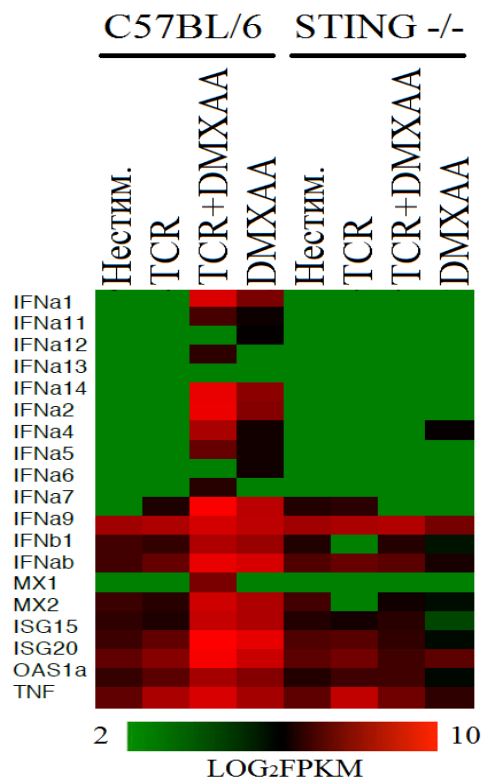


Рис . 7. Тепловая карта уровня экспрессии некоторых генов наивных C57BL/6 и STING дефицитных CD3⁺ клеток, которые стимулировались анти CD3, анти CD28 и DMXAA.

один из этих путей сигналинга, приводящих к смерти, не активируется с помощью DMXAA в макрофагах.

Сравнение активации путей сигналинга показало значительные различия между макрофагами и STING дефицитными Т-клетками.

В связи с тем, что летальность, индуцированная цДН в клетках врожденного иммунитета, не наблюдалась, трудно было бы ожидать роста экспрессии проапоптотических генов в макрофагах. Возможно, это явление связано с тем, что клетки врожденного иммунитета должны переживать угрозы, активирующие STING для инициации дальнейшего

иммунного ответа, а в случае детекции STING вирусной инфекции или повреждения внутренней ДНК в Т-клетке, для хозяина предпочтительнее ее элиминация.

Также STING индуцированная клеточная смерть может объяснить и блокировку пролиферации Т-клеток мышей C57BL/6, в связи со снижением экспрессии генов клеточного цикла и путей сигналинга IL-2 в ответ на DMXAA. При этом основная функция IL-2 связана с распространением и развитием Т-клеток.

Анализ сигнальных путей неожиданно показал, что гены UPR, в частности Bip/HSPA5 и GADD, были сильно апрегулированы, как и ISGs. Нарастание в ЭПР (эндоплазматический ретикулум) концентрации белков, не прошедших фолдинг, или тех, в которых он прошел неправильно, приводит к стрессу ЭПР и блокировке трансляции белка, что способствует гибели клетки. Активация UPR решает проблемы, приводящие к этому типу стресса, и предотвращает смерть

клетки, повышая емкость ЭПР для фолдинга (Szegezdi et al., 2006; Tabas, Ron, 2011). Стимуляция ТКР в чистом виде способна индуцировать UPR, так как активированные клетки наращивают синтез для нужд пролиферации. В то же время сигналинг ТКР индуцирует выброс Ca^{2+} и его перемещения в ЭПР, а, как известно, этот ион может взаимодействовать с процессом фолдинга белков и вызывать UPR. Обусловленная активацией транслокация STING из мембраны ЭПР может приводить к дальнейшим изменениям баланса ионов кальция, что даст слишком высокую нагрузку на процесс UPR и приведет к стрессу и как результат – клеточной смерти.

6. Влияние STING на элиминацию клеток

Основываясь на данных, полученных в результате сиквенса РНК, было выдвинуто предположение, что DMXAA может активировать проапоптотический сигналинг STING-опосредованно и, возможно, индуцируя судьбоносный для клетки UPR. Однако полученные данные позволяют предполагать, что апоптотический путь смерти Т-клеток, инициированный DMXAA, при необходимости может заменяться на некроптотический. Так же было выяснено, что без стимуляции ТКР концентрация DMXAA ниже 5 мкг/мл не приводит к смерти Т-клеток.

Следующим этапом исследования была проверка на наличие взаимосвязи клеточной смерти со STING и UPR. В связи с данными о том, что в макрофагах активация UPR, которая происходит при стимуляции PRR, требует активации XBP-1 путем нетрадиционного сплайсинга (Smith et al., 2008), было решено протестировать Т-клетки на наличие такой же реакции при активации STING с помощью DMXAA. При этом наблюдалось увеличение экспрессии ISGs и снижение экспрессии анти-апоптотических генов, что весьма важно и соответствует данным, полученным при РНК-сиквенсе. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет проследить связь между активацией STING в Т-клетках, индукцией UPR и последующей клеточной смертью, возможно в связи с провалом борьбы с ЭПР-стрессом.

Отсутствие элиминации Т-клеток в построенной *in vivo* модели может являться дозозависимым, так как концентрация DMXAA, влияющего на Т-клетки, ниже, чем в экспериментах *in vitro*. Другой причиной может быть влияние

окружающих клеточных популяций, которое невозможно учесть в эксперименте *in vitro*.

Суммируя вышеизложенный материал, можно сделать заключение о влиянии белковых продуктов генов *cFlar* и *Tmem173* на механизмы, определяющие запрограммированную клеточную смерть. Возможность активации Т-клеток синтетическими агонистами STING раскрывает огромный потенциал использования этого явления в медицине.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования впервые установлена роль инсерции в 21 п.н. в области пятого экзона гена *cFlar*, тканеспецифично влияющая на сплайсинг мРНК данного гена, и, как результат, определяющая устойчивость мышей линии MSM к CD95-зависимой смерти. Модель устойчивости к апоптозу, на основании данных, полученных по линии MSM, относится к одной из догм в данной области. Слабый сигнал ожидаемо коррелирует со смертью у клеток первого типа, а сильный со смертью у клеток второго типа.

В результате проделанных исследований локуса, кодирующего STING, можно сделать два заключения. Во-первых, по аналогии с клетками врожденного иммунитета, в Т-клетках сигнальный путь STING индуцирует ответ IFN типа I. Это является весомым дополнением к тем фактам, что PRR функционируют в Т-клетках, однако активация ТКР приводит к ответу, не являющемуся взаимозависимым от STING агонистов. Во-вторых, была показана STING-зависимая индукция UPR и элиминация Т-клеток, что ранее не было описано для клеток миелоидного ряда.

ВЫВОДЫ

1. Анализ сцепления в поколении F2 от интеркросса C57BL/6 x MSM выявил несколько локусов MSM, контролирующих устойчивость к Fas-опосредованной клеточной смерти, включая локусы гена каспазы 8 и FADD-подобного регулятора апоптоза *cFlar*, кодирующего cFLIP. С помощью QTL-анализа сцепления установлена связь между выживанием и соответствующими геномными локусами на панели F2 мышей. 2D-анализ, определяющий наследование генных локусов, расположенных на разных хромосомах,

идентифицировал локусы на хромосомах 1 и 7. Геномная область на хромосоме 1 была проксимальна как для гена каспазы 8, так и для гена cFLIP.

2. Устойчивость к программированной клеточной смерти, опосредованной рецептором Fas/CD95, у мышей линий C57BL/6 и MSM обусловлена соотношением сплайс-изоформ cFLIP_L и cFLIP_R. в печени: клетки печени MSM преимущественно экспрессируют вариант cFLIP_L, в отличие от клеток печени C57BL/6, которые имеют более высокие уровни cFLIP_R. В печени MSM каспаза 8 присутствует исключительно в виде расщепленного продукта p43, связанного с cFLIP_L и предотвращающего ее расщепление до p10/20, который, в свою очередь, необходим для активации каспазы 3 и запуска Fas/CD95-индуцированной клеточной смерти.
3. В области пятого экзона гена *cFlar* идентифицирована инсерция в 21 п.н., влияющая на дифференциальный сплайсинг мРНК cFLIP. Данная область является 3'-UTR для cFLIP_R и интронной областью для cFLIP_L, обуславливает высокое содержание изоформы cFLIP_L в печени мышей линии MSM за счет преимущественного образования мРНК cFLIP_L путем альтернативного сплайсинга. Инсерция отсутствует у мышей C57BL/6, но сохраняется в других линиях дикого типа.
4. Стимуляция синтетическим STING-агонистом DMXAA *Tmem173*/STING Т-клеток мышей линии C57BL/6 приводит к выработке нехарактерного для них IFN типа I (IFN- β) и индукции экспрессии интерферон-стимулирующих генов (ISGs), аналогично ответу макрофагов и дендритных клеток, что указывает на функционирование в Т-клетках паттерн распознающих рецепторов.
5. Активация сигнальных путей в ответ на стимуляцию синтетическим STING-агонистом DMXAA *Tmem173*/STING в Т-клетках мышей линии C57BL/6 приводит к индукции клеточного стресса и программируемой клеточной смерти (апоптозу), которые обусловлены реакцией на несвернутые белки (UPR-реакцией) и накопление их в ЭПР.

Работы, опубликованные по теме диссертации

В рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. Sarhan, J. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis / J. Sarhan, B. Liu, H. Muendlein, C. Weindel, I. Smirnova, A. Tang, **V. Ilyukha**, M. Sorokin, A. Buzdin, K. A. Fitzgerald, A. Poltorak // Cell Death & Differentiation. – 2019. – Т. 26. – №. 2. – С. 332-347.
2. Liu, B. Constitutive interferon maintains GBP expression required for release of bacterial components upstream of pyroptosis and anti-DNA responses / B. Liu, J. Sarhan, A. Panda, H. Muendlein, **V. Ilyukha**, J. Coers, M. Yamamoto, R. Isberg, A. Poltorak // Cell reports. – 2018. – Т. 24. – №. 1. – С. 155-168.
3. Larkin, B. Cutting edge: activation of STING in T cells induces type I IFN responses and cell death / B. Larkin, **V. Ilyukha**, M. Sorokin, A. Buzdin, E. Vannier, A. Poltorak // The Journal of Immunology. – 2017. – Т. 199. – №. 2. – С. 397-402.
4. Ram, D. Balance between short and long isoforms of cFLIP regulates Fas-mediated apoptosis in vivo / D. Ram, **V. Ilyukha**, T. Volkova, A. Buzdin, A. Tai, I. Smirnova, A. Poltorak // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – Т. 113. – № 6. – С. 1606-1611.
5. Surpris, G. Cutting edge: novel Tmem173 allele reveals importance of STING N terminus in trafficking and type I IFN production / G. Surpris, J. Chan, M. Thompson, **V. Ilyukha**, B.C. Liu, M. Atianand, S. Sharma, T. Volkova, I. Smirnova, K.A. Fitzgerald, A. Poltorak // The Journal of Immunology. – 2016. – Т. 196. – №. 2. – С. 547-552.
6. Poltorak, A. Type I interferon-associated signaling in T cells: The novel functions of STING / A. Poltorak, O.V. Kurmyshkina, B. Larkin, G. Surpris, **V.V. Ilyukha**, T.O. Volkova // Cytokine. 2015. Vol. 76. Issue 1. P. 78-79.
7. Полторак, А.Н. Новые функции внутриклеточного ДНК-сенсора STING при иммунном ответе / А.Н. Полторак, **В.В. Илюха**, О.В. Курмышкина, Е.М. Вижужева, Т.О. Волкова // Российский иммунологический журнал. 2015. Т.9(18). №3(1). С.163-164.

В прочих изданиях:

8. **Ilyukha, V.** Inflammatory response regulated a kinase activity of RIP1 kinase / **V. Ilyukha**, S. Schworer, A. Poltorak // Высокопроизводительное секвенирование в геномике. – 2017. – С. 81-81 (Acta Naturae, спецвыпуск).
9. Шабалина, И.М. Модели и методы QTL анализа в исследовании влияния генотипа на транскриптом на примере мышинной модели / И.М. Шабалина, **В.В. Илюха**, Е.Ю. Фурта // Фундаментальные исследования, методы проектирования, программно-техническая платформа корпоративных информационных систем: Материалы 15-ой Национальной молодежной

научно-практической конференции, 27-29 ноября 2017 года.- Новочеркасск: Издательство ООО "Лик".- 2017.- С. 68-73.

10. Шабалина, И.М. Математические модели и методы QTL анализа в исследовании влияния генотипа на транскриптом на примере мышинной модели / И.М. Шабалина, **В.В.Илюха**, Е.Ю. Фурта // Фундаментальные исследования, методы и алгоритмы прикладной математики в технике, медицине и экономике: Материалы 16-ой Международной молодежной научно-практической конференции, 26-27 октября 2017 года.- Новочеркасск: Издательство ООО "Лик".- 2017.- С. 181-186.

Список сокращений

3'-UTR - 3'-нетранслируемая область (от англ. 3'-untranslated region),
АЛТ – аланинаминотрансфераза,
ДМЕМ – среда Дубеко модифицированная Иглом,
п.н. – пар нуклеотидов,
ТКР – Т-клеточный рецептор,
цДН – циклический динуклеотид,
ЭПР – эндоплазматический ретикулум,
сFlar – Каспаза 8 и FADD подобный регулятор апоптоза (от англ. Caspase 8 And FADD Like Apoptosis Regulator),
CFSE - Сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина (от англ. Carboxyfluorescein succinimidyl ester),
DMXAA–5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота,
FAS – фактор апоптотического семейства (от англ. factor apoptosis superfamily),
ISGs – интерферонстимулирующие гены (от англ. Interferon stimulating genes),

Jo2 – моноклональные антитела, агонисты FASR (по авт. J.Ogasawara),
MegaFasL – многомерный Fas-лиганд (от англ. Multimeric Fas-Ligand),
МНС – главный комплекс гистосовместимости (от англ. Major histocompatibility complex),
PRR–, патоген распознающие рецепторы (от англ. Pathogen recognition receptors),
RPMI – среда Roswell Park Memorial Institute,
STING – стимулятор интерфероновых генов (от англ. Stimulator of interferon genes),
TLR – толл-подобные рецепторы (от англ. Toll-like receptors),
Tmem173 – трансмембранный протеин 173 (от англ. Transmembrane protein 173),
UPR – ответ на белки не прошедшие фолдинг (от англ. unfolded protein response).