

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ СИСТЕМЫ ИНТЕРФЕРОНА ПОД ВЛИЯНИЕМ ДРОЖЖЕВОЙ ДУСПИРАЛЬНОЙ РНК

2019 г. А. В. Батенева*, С. Г. Гамалей, Л. Р. Лебедев,
Е. Д. Даниленко

*E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск,
Новосибирская область, Россия

Поступила: 12.03.2019. Принята: 25.03.2019

В экспериментах на мышах исследован уровень экспрессии белков, опосредующих противовирусный ответ, в перитонеальных макрофагах в ответ на внутрибрюшинное введение дуспиральной РНК (дсРНК) из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучена дозовая (0,5 и 1,5 мг/кг) и временная (5 и 24 ч) зависимость влияния дсРНК на активность генов, кодирующих рецептор TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета, 2',5'-олигоденилатсинтетазу (OAS) и протеинкиназу R. Полученные результаты свидетельствуют о повышении в клетках уровня транскрипционной активности, наиболее выраженном в отношении генов TLR3, ИФН-альфа и OAS. Максимальный эффект был отмечен при введении дсРНК в эффективной противовирусной дозе (0,5 мг/кг) через 5 часов после введения.

Ключевые слова: дсРНК, TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета, 2',5'-олигоденилатсинтетаза, протеинкиназа R, экспрессия генов, перитонеальные макрофаги, мыши

DOI: 10.31857/S102872210006752-2

Адрес: 633010, г. Бердск-10 Новосибирской области, ул. Хим-заводская, 9, а/я 112, Батенева А. В.

Телефон: (383) 363-80-14. Факс: (383) 363-80-16.

E-mail: kanz_imbt@vector.nsc.ru

Авторы:

Батенева А. В., научный сотрудник отдела биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Гамалей С. Г., зав. отделом биологических исследований ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Лебедев Л. Р., д.б.н., зав. лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия;

Даниленко Е. Д., к.б.н., директор ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, система интерферона (ИФН) является важнейшей составляющей врожденного иммунитета. Среди веществ – стимуляторов данной системы широко известны дуспиральные РНК (дсРНК), способные вызывать индукцию ИФН 1 типа и активировать ИФН-зависимые ферменты, участвующие в реализации противовирусной реакции. Ключевыми ферментами,

подавляющими репликацию вирусов в клетках, являются 2',5'-олигоденилатсинтетаза (OAS), РНКазы L и протеинкиназа R (PKR). Изучению механизмов противовирусного действия дсРНК посвящено значительное количество работ, однако эти исследования ограничены преимущественно системами *in vitro* [1]. Поэтому изучение особенностей внутриклеточного действия природных дсРНК после их введения в живой организм по-прежнему остается актуальной задачей.

Природная дсРНК, выделенная из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, является одним из активных компонентов отечественного препарата Ридостин (патент РФ № 2083221). В процессе доклинических и клинических исследований было показано, что Ридостин стимулирует выработку эндогенного ИФН разных типов, повышает клеточный иммунитет, подавляет репродукцию вирусов и развитие внутриклеточных микроорганизмов. Установлено, что препарат дсРНК способен усиливать фагоцитарную, метаболическую и бактерицидную активность перитонеальных макрофагов [2]. Макрофаги, как известно, экспрессируют разные типы сигнальных рецепторов, в том числе

Toll-like рецептор 3 типа (TLR3), являющийся специфическим рецептором дсРНК [3]. Связывание дсРНК с TLR3 приводит к активации сигнальных путей и индукции транскрипции генов ИФН и воспалительных цитокинов [4]. В связи с этим, макрофаги являются интересным объектом для изучения особенностей развития внутриклеточной противовирусной реакции под действием дсРНК.

Цель исследования — изучение влияния дрожжевой дсРНК на экспрессию генов рецептора TLR3 и противовирусных белков ИФН-альфа, ИФН-бета, OAS, PKR в перитонеальных макрофагах мышей после внутрибрюшинного введения препарата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовали препарат дсРНК (мол. вес 5800–7400 п.н.) с чистотой 93%, полученный из натриевой соли двуспиральной рибонуклеиновой кислоты, субстанции Ридостина (ООО «Диафарм», г. Бердск Новосибирской области). Исследования проводили на самцах мышей линии Balb/c.

Раствор дсРНК вводили внутрибрюшинно однократно в дозах 0,5 и 1,5 мг/кг, что соответствует эффективной противовирусной дозе препарата Ридостина дозе, превышающей ее в три раза (в пересчете на дсРНК). Животным контрольной группы вводили растворитель физиологический раствор. Через 5 и 24 ч после введения препарата забирали перитонеальный экссудат для получения культуры макрофагов. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 0,004% гентамицина, при 37 °C и 5% CO₂ в течение 2 ч. После получения монослоя макрофагов клетки подсчитывали, лизировали и выделяли суммарную РНК. Содержание РНК и чистоту полученных образцов определяли спектрофотометрически. Оценку уровня экспрессии дсРНК-активируемых генов TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета, OAS и PKR проводили методом ПЦР в реальном времени. Последовательность специфических праймеров была выбрана из Банка праймеров Гарвардского университета (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>), синтез осуществлен ЗАО «Синтол». Специфичность и размер продуктов реакции определяли по кривой плавления и электрофорезом в агарозном геле. Уровень относительной экспрессии генов оценивали методом ΔCt .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование показало, что препарат дсРНК усиливал экспрессию генов TLR3, ИФН-альфа, ИФН-бета и OAS в перитонеальных макрофагах мышей. Наиболее выраженное повышение транскрипционной активности было отмечено через 5 часов после введения. Препарат дсРНК в дозе 0,5 мг/кг в этот срок более активно повышал уровень транскрипции генов TLR3 (в 27 раз, по отношению к контролю), ИФН-альфа (в 70 раз), OAS (в 43 раза) и умеренно — ИФН-бета (в 9,2 раза). Активирующий эффект препарата в дозе 1,5 мг/кг был более слабым, чем в дозе 0,5 мг/кг. Кратность стимуляции транскрипции генов после введения большей дозы дсРНК составляла: для TLR3 — 13 раз, ИФН-альфа — 21 раз, OAS — 10,6 раза, ИФН-бета — 5,8 раза. То есть, в данном случае наблюдался эффект обратной дозовой зависимости генной индукции, характерный для индукторов интерферона. Как известно, для каждого индуктора существует определенный диапазон доз для осуществления максимальной ИФН-индуцирующей активности. Увеличение или уменьшение дозы приводит к снижению синтеза ИФН.

К концу первых суток после введения дсРНК эффект стимуляции заметно снижался в обеих опытных группах, однако в случае введения препарата в дозе 1,5 мг/кг — в меньшей степени. Более высокими в этот период были показатели синтеза мРНК OAS (увеличение в 6,7 и 9,7 раза, соответственно, для дозы 0,5 и 1,5 мг/кг), TLR3 (в 3,7 и 5,1 раза) и ИФН-бета (в 2,7 и 7,7 раза). Уровень транскрипции гена ИФН-альфа через сутки после введения не отличался от контрольного.

Динамика изменения транскрипции гена PKR значительно отличалась от описанной выше для других генов. Признаков активации гена PKR через 5 ч после введения дсРНК в дозе 0,5 мг/кг не обнаружено, а трехкратная доза подавляла экспрессию гена, по сравнению с контролем, в 6,7 раза. Активность гена PKR незначительно возрастала только через сутки после введения дсРНК, и в этой временной точке превышала контрольный уровень в 1,9 и 2,5 раза для дозы 0,5 и 1,5 мг/кг, соответственно. Как известно, индукция ИФН-зависимых белков существенным образом зависит от природы клеток, концентрации дсРНК, типа секретируемого ИФН. Так, авторы работы [5] показали, что ферментативная активность PKR проявляется исключительно при низкой концентрации дсРНК (10^{-7} – 10^{-9} г/мл),

и наоборот, OAS максимально активна при высокой концентрации (10^{-5} г/мл и выше). В условиях данного эксперимента доза препарата при внутрибрюшинном введении составляла 1 и 3×10^{-5} г на животное, что, вероятно, и повлияло на динамику индукции генов OAS и PKR.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что dsРНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* вызывает активацию генов рецептора TLR3, ИФН первого типа и фермента OAS в перитонеальных макрофагах мышей. Динамика эффекта носит дозозависимый характер: препарат в эффективной противовирусной дозе оказывает более выраженный активирующий эффект в первые часы после введения, в то время как трехкратная доза оказывает более длительное активирующее действие на транскрипцию генов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Zhang Sh., Herman M., Ciancanelli M., Diego R., Sanchi-Shimizu V., Abel L., Casanova J. TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Current Opinion in Immunology*. 2013, 25, 19–33.
2. Даниленко Е.Д., Сысоева Г.М., Рослякова Е.Ю., Аликин Ю.С., Масычева В.И. Влияние L- и M-форм двуспиральных РНК из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на функцию фагоцитов. Вестник Уральской медицинской академической науки. 2010, 4(32), 39–42. [Danilenko E. D., Sysoeva G. M., Roslyakova E. Yu., Alikin Yu. S., Masycheva V. I. Effect of L- and M-forms of double-stranded RNA from yeast *Saccharomyces cerevisiae* on the function of phagocytes. *Bulletin of the Ural Medical Academic Science*. 2010, 4(32), 39–42].
3. Applequist S. E., Wallin R., Ljunggren H.-G. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *International Immunology*. 2002, 14(9), 1065–1074.
4. Соколова Т.М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. В сб. науч. статей «Интерферон-2011», М. 2012, 52–63 [Sokolova T. M. Immune recognition of viral nucleic acids leads to the induction of interferons and inflammatory cytokines. In the collection of scientific articles “Interferon-2011”. М. 2012, 52–63].
5. Williams B., Gilbert C., Kerr I. The respective roles of the protein kinase and pppA2' p5' A2' p5' A-activated endonuclease in the inhibition of protein synthesis by double stranded RNA in rabbit reticulocyte lysates. *Nucleic Acids Research*. 1979, 6(4), 1335–1350.

ACTIVATION OF INTERFERON SYSTEM GENE TRANSCRIPTION BY YEAST DOUBLE-STRANDED RNA

© 2019 A. V. Bateneva*, S. G. Gamaley, L. R. Lebedev, E. D. Danilenko

*E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru

Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia

Received: 12.03.2019. Accepted: 25.03.2019

In experiments on mice, the level of expression of antiviral-response-mediating proteins was studied in peritoneal macrophages, in reaction to the intraperitoneal administration of double-stranded RNA (dsRNA) from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Dose (0.5 and 1.5 mg/kg) and time (5 and 24 hours) dependencies of the effect of dsRNA on the activity of genes encoding Toll-like receptor 3 (TLR3), IFN- α , IFN- β , 2',5'-oligoadenylatesynthetase (OAS) and protein kinase R were determined. The obtained results indicate the increase in the level of transcriptional activity in the cells, most pronounced for TLR3, IFN- α and OAS genes. The maximum effect was observed 5 hours after the administration of dsRNA in the effective antiviral dose (0.5 mg / kg).

Key words: dsRNA, TLR3, IFN- α , IFN- β , 2',5'-oligoadenylatesynthetase, protein kinase R, gene expression, peritoneal macrophages, mice

Authors:

Bateneva A. V., ✉ Researcher, Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: bateneva_av@vector.nsc.ru;

Gamaley S. G., Head of Department of Biological Research, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

Lebedev L. R., Dr.habil., Head of the laboratory of Nucleic Acids and Recombinant Proteins, Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia;

Danilenko E. D., Ph.D., director of Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor, Berdsk, Novosibirsk Region, Russia.