

На правах рукописи

Грачёв Алексей Николаевич

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ
ПЛАСТИЧНОСТЬ МАКРОФАГОВ ВТОРОГО ТИПА
АКТИВАЦИИ

14.00.14 - онкология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

МОСКВА-2008

Работа выполнена в Институте канцерогенеза Российского
Онкологического Научного Центра им. Н.Н.Блохина Российской Академии
Медицинских Наук и на Медицинском Факультете г. Маннгейм,
Университета Гейдельберга

Официальные оппоненты:

докт. биол. наук, проф.

А.С. Апт

чл.-корр. РАН, докт. хим. наук, проф.

А.Г. Габибов

докт. мед. наук, проф.

З.И. Кадагидзе

Ведущая организация:

Институт Иммунологии ФМБА России

Защита диссертации состоится «__»_____ 200__ г. в ___ час. на
заседании диссертационного совета (Д.001.017.01, К.001.017.01) ГУ
Российского онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина РАМН,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ Российского
онкологического научного центра им. Н.Н.Блохина.

Автореферат разослан «__»_____ 200__ г

Ученый секретарь диссертационного совета

Докт. мед. наук, проф.

Ю.В. Шишкин

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время, масштабные исследования, проводимые по всему миру, позволяют утверждать, что все органы и ткани организма находятся под постоянным контролем иммунной системы, активность которой регулируется ее врожденным компонентом. Основными клетками врожденного иммунитета являются макрофаги, развивающиеся из моноцитов периферической крови и имеющиеся во всех органах и тканях. В здоровом организме макрофаги отвечают за поддержание гомеостаза ткани, а так же за своевременный ответ на вторжение патогена, повреждение или появление трансформированных клеток. Нарушение функций макрофагов приводит к развитию хронических воспалений, аутоиммунных заболеваний, а также к инициации и прогрессии опухолей. Последнее десятилетие было отмечено учащающимися попытками разработать клеточную иммунотерапию для лечения злокачественных опухолей. Наиболее часто предпринимались попытки инициировать противоопухолевый иммунный ответ при помощи антигенпрезентирующих клеток. Однако до сих пор ни одна из этих попыток не увенчалась успехом и не привела к разработке надежно работающей терапии. Так почему же используемые антигенпрезентирующие клетки не способны активировать требуемый иммунный ответ? Опухоль развивается при постоянном взаимодействии с иммунной системой организма и способна не только пассивно избегать узнавания, но и активно влиять на иммунную систему. Растворимые факторы, производимые опухолевыми клетками, способны привлекать моноциты, которые в результате контакта с опухолевыми клетками и под воздействием опухолевого микроокружения развиваются в особый тип опухоли ассоциированных макрофагов, которые способны локально подавлять противоопухолевый иммунный ответ. Таким образом, для успешного использования потенциала иммунной системы при лечении опухолей необходимо учитывать активность и индивидуальные особенности опухоли ассоциированных макрофагов. Проводимые исследования опухоли ассоциированных макрофагов выявили их схожесть с макрофагами второго типа активации, обладающими противовоспалительными и иммуносупрессорными свойствами. Однако, недостаточная изученность свойств макрофагов второго типа активации пока не позволяет использовать их в качестве мишени для разработки противоопухолевой иммунотерапии.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы было исследование гетерогенности и пластичности фенотипа первичных человеческих макрофагов в культуре *in vitro*. В ходе работы были решены следующие задачи:

1. Описана функция маркера макрофагов второго типа активации - многофункционального сквенджер рецептора стабилина-1.
2. Уточнена концепция молекулярной и функциональной гетерогенности популяции макрофагов второго типа на примере макрофагов, стимулированных IL-4 и дексаметазоном.
3. Проверена гипотеза о способности макрофагов изменять свое функциональное состояние в зависимости от изменения условий внешней среды. Показана способность различных популяций макрофагов отвечать на бактериальные стимулы (LPS и MDP), Th1 цитокин IFN γ , Th2 цитокин IL-4 и дексаметазон.
4. Выявлены маркеры макрофагов второго типа стимулированных трансформирующим фактором роста бета (TGF- β).
5. Исследована способность зрелых макрофагов отвечать на трансформирующий фактор роста бета. Показано, что глюкокортикоиды необходимы для поверхностной локализации рецептора к TGF- β и проведен глобальный анализ экспрессии генов, активированных в зрелых макрофагах TGF- β .

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В настоящей работе представлены новые маркеры макрофагов второго типа, экспрессирующиеся при стимуляции макрофагов интерлейкином (IL)-4, дексаметазоном, трансформирующим фактором роста бета и их комбинациями. Полученные данные позволяют утверждать, что популяция макрофагов второго типа гетерогенна. Клонирован и описан новый маркер макрофагов второго типа – стаблин-1. Функциональные исследования стабилина-1 показали, что этот белок является многофункциональным сквенджер рецептором, обладающим широким спектром лигандов. Проверена гипотеза о пластичности макрофагального фенотипа. В рамках этой части работы впервые показано, что макрофаги сохраняют способность отвечать на бактериальные стимулы, независимо от типа дифференцировки, что гарантирует своевременный и эффективный ответ на инфекцию. Исследование влияния TGF- β на молекулярный репертуар макрофагов выявил активацию рецептора IL17RB при комбинированной стимуляции макрофагов IL-4 и TGF- β . Дальнейшее исследование воздействия TGF- β на макрофаги позволило обнаружить физиологические условия, необходимые для сохранения макрофагами

способности отвечать на данный ростовой фактор. В опровержение бытующего мнения о неспособности макрофагов отвечать на TGF- β , представленные в работе данные указывают на то, что наличие глюкокортикоидов в культуральной среде является необходимым и достаточным условием для сохранения поверхностной экспрессии рецептора и способности макрофагов отвечать на стимуляцию TGF- β . Эти результаты впервые позволили исследовать фенотип макрофагов, формирующийся под воздействием TGF- β . Описанные маркеры существенно расширяют возможности по выявлению макрофагов в различных онкологических и хронических воспалительных заболеваниях. Обнаруженная пластичность макрофагального фенотипа открывает новые возможности для манипуляции фенотипом макрофагов при лечении различных заболеваний. Обнаруженный эффект глюкокортикоидов указывает на необходимость учитывать данное свойство этого иммуносупрессора при использовании его для терапии, а так же открывает перспективы для дальнейшего изучения механизма действия глюкокортикоидов на внутриклеточный транспорт.

АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

Основные результаты диссертации были представлены на международных научных конференциях и симпозиумах. В том числе на ежегодных конференциях Европейского Общества исследования Макрофагов и Дендритных клеток – European Macrophage and Dendritic Cell Society (2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006 и 2007 г.), на конференциях Германского Иммунологического Общества – Deutsche Gesellschaft für Immunologie (2004, 2005, 2006 и 2007 г.), на конференциях Общества Биологии Лейкоцитов – Society for Leukocyte Biology (2004, 2005, 2006, 2007 г.), на симпозиумах Keystone (2005, 2006, 2007, 2008 г.).

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 214 страницах, содержит 52 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 294 источника.

ПУБЛИКАЦИИ

Диссертация обобщает данные 17 основных статей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

МАРКЕРЫ МАКРОФАГОВ ВТОРОГО ТИПА АКТИВАЦИИ

Несмотря на сформировавшуюся концепцию дихотомии макрофагальной активации, длительное время количество молекулярных особенностей, характеризующих макрофаги второго типа, было ограниченным. Поэтому, с

целью обнаружения новых маркеров и более полного понимания функциональных особенностей макрофагов второго типа, были применены несколько экспериментальных подходов. Эти подходы включали получение антител специфично реагирующих с макрофагами второго типа и последующий анализ антигенов, субтрактивную гибридизацию, анализ функциональных групп генов, выбранных на основании литературных данных, и использование биочипов.

Клонирование человеческого и мышиноного стабилина-1

На начальном этапе целью работы было исследование функции одного из маркеров макрофагов второго типа - антигена MS-1, позднее получившего название стабилина-1. Для клонирования и дальнейшего анализа, антиген MS-1 был выделен из первичных человеческих макрофагов и проанализирован при помощи методики MALDI-TOF, что позволило определить фрагмента 3-ей хромосомы, потенциально содержащий ген, кодирующий антиген MS-1. При помощи компьютерного анализа полученного геномного фрагмента была определена его экзон-интронная структура, что позволило амплифицировать и клонировать большую часть кодирующей последовательности. Для клонирования 5'-конца мРНК, была использована методика 5'-RACE. Окончательный вариант последовательности человеческого стабилина-1 был помещен в базу данных EMBL под номером AJ275213. Для клонирования полноразмерного мышиноного стабилина-1 использовалась та же стратегия, что и для клонирования человеческого гена. Полученная последовательность была помещена в базу данных EMBL под номером AF290914. Сравнение последовательностей мышиноного (линия BALB/c) и человеческого стабилина-1 показало, что на уровне мРНК гены идентичны на 83%. Белки, в свою очередь, были идентичны на 82%.

Анализ экспрессии стабилина в различных тканях

Экспрессию мРНК стабилина-1 в различных клетках исследовали при помощи Норттерн блот гибридизации, используя РНК, выделенную из первичных человеческих макрофагов, эндотелиальных клеток и различных клеточных линий. Кроме того, для анализа экспрессии мРНК стабилина-1 в различных тканях использовали готовые мембраны производства фирмы Clontech, содержащие образцы РНК, выделенной из различных тканей человека - так называемые MTN (multiple tissue Northern). Экспрессия стабилина-1 обнаруживалась преимущественно в макрофагах второго типа (M2), стимулированных IL-4, дексаметазоном или их комбинацией (Рис. 1).

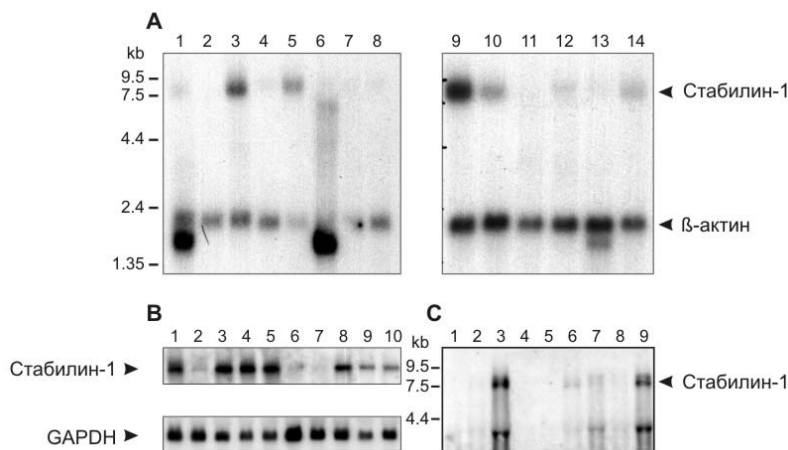


Рисунок 1. Анализ экспрессии стабилина-1. А. Анализ экспрессии мРНК стабилина-1 в различных тканях при помощи Норзерн блот гибридизации. Дорожки с 1 по 14 содержат образцы мРНК выделенной из сердца (1), мозга (2), тимуса (3), плаценты (4), легких, печени (5), скелетных мышц (6), почек (7), поджелудочной железы (8), селезенки (9), лимфатических узлов (10), тимуса (11), лейкоцитов периферической крови (12), костного мозга (13), фетальной печени (14). Банды соответствующие стабину-1 и β -актину указаны стрелками. В. Анализ экспрессии мРНК стабилина-1 в первичных человеческих макрофагах при помощи Норзерн блот гибридизации. На дорожки с 1

по 5 нанесена РНК, выделенная из макрофагов на 3 день культивирования, на дорожки с 6 по 10 нанесена РНК, выделенная из макрофагов на 6 день культивирования. Дорожки 1 и 6 – нестимулированные макрофаги, дорожки 2 и 7 – макрофаги, стимулированные *IFN*-гамма, дорожки 3 и 8 – макрофаги, стимулированные *IL*-4, дорожки 4 и 9 – макрофаги, стимулированные дексаметазоном, дорожки 5 и 10 – макрофаги, стимулированные *IL*-4 и дексаметазоном. С. Анализ экспрессии стабилина-1 в клеточных линиях при помощи Норзерн блот. Дорожки с 1 по 6 содержат образцы РНК, выделенной из клеток *Huv*es, *Huv*es 926, *Hua*es, *HerG2*, *HL 60*, *CDC* соответственно. Дорожки с 7 по 9 содержат РНК, выделенную из макрофагов на 3-й день культивирования. Дорожка 7 – нестимулированные макрофаги, дорожка 8 – *IFN*-гамма стимулированные макрофаги, *IL*-4 и дексаметазон стимулированные макрофаги – дорожка 9.

Анализ экспрессии мРНК стабилина-1 в различных органах показал, что стабину-1 экспрессируется в плаценте (содержащей большое количество макрофагов второго типа), поджелудочной железе, печени и лимфатических узлах (Рис. 1А). Анализ клеточных линий показал, что большинство проанализированных клеточных линий стабину-1 не экспрессируют (Рис. 1С).

Анализ структуры белка стабилина-1

Анализ аминокислотной последовательности человеческого стабилина-1 позволил определить, что теоретический молекулярный вес белка равен 275 кДа. Предсказанный молекулярный вес соответствовал наблюдавшемуся ранее в Вестерн блот анализе белку размером около 280 кДа (Goerdet et al, 1991) а так же рекомбинантному стабину-1.

Анализ вторичной структуры белка при помощи программы PREDATOR показал, что стабину-1 содержит несколько α -спиралей и β -листов. Поиск доменов при помощи баз данных PROSITE и Pfam выявил наличие 3 тандемов фасциклиновых доменов и одного одиночного фасциклинового домена на С-конце белка. Кроме того были обнаружены 16 EGF-подобных доменов и 3 ламининовых EGF-подобных домена (Рис. 2). На С-конце белка был обнаружен Х-линк домен, характерный для гиалурон-связывающих белков. Поиск других доменов, участвующих в связывании гиалурона, выявил 3 V(X₇)V домена. Анализ гидрофобности стабилина-1 позволил предсказать наличие сигнального пептида, состоящего из 25 аминокислот на N-конце белка. Трансмембранный домен находился непосредственно за последним фасциклиновым доменом (Рис. 2). Анализ последовательности стабилина-1 при помощи программы для поиска

сигналов определяющих внутриклеточную локализацию белка – PSORT позволил предположить, что стабиллин-1 курсирует между плазматической мембраной и эндосомальным компартиментом.

Исходя из доменной структуры белка и участия в эндоцитозе в эндотелиальных клетках печени, стабиллин-1 был классифицирован как скавенджер рецептор (Hansen et al, 2005; Horiuchi et al, 2003).

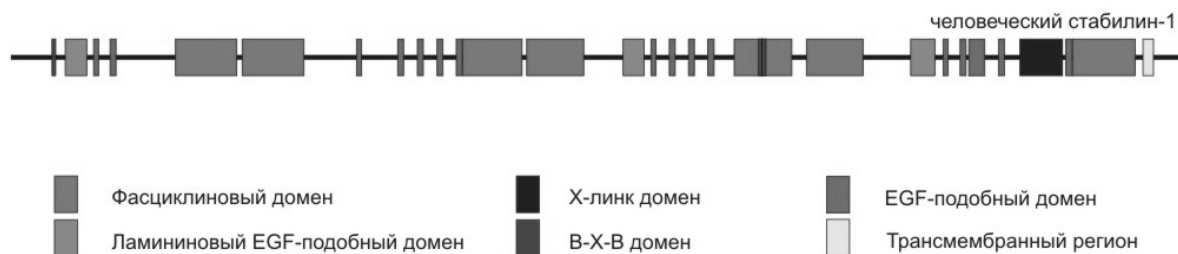


Рисунок 2. Структура человеческого стабиллина-1

Стабиллин-1 отвечает за эндоцитоз acLDL в стабильно трансфецированных клетках CHO

Для исследования эндоцитозной активности стабиллина-1 был использован acLDL, являющийся, по сообщению Прево и коллег, лигандом стабиллина-1. (Prevo et al, 2004). Эффективность эндоцитоза определяли при помощи проточной цитометрии. После 30 мин инкубации в присутствии acLDL-Alexa488, в клетках, трансфецированных стабилином-1, наблюдалось 10-и кратное по сравнению с клетками, трансфецированными пустым вектором, количество acLDL (Рис. 3). Эти данные прямо указывают на участие стабиллина-1 в эндоцитозе acLDL.

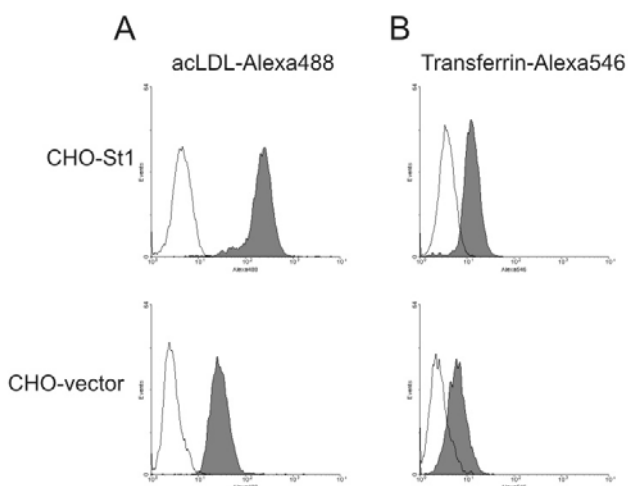


Рисунок 3. Анализ стабиллин-1-зависимого эндоцитоза в клетках CHO-K1 при помощи проточной цитометрии. Незаштрихованные гистограммы: клетки без добавления лиганда, заштрихованные гистограммы: клетки были проинкубированы с лигандом в течение 30 мин при 37°C. (A) Эндоцитоз acLDL-Alexa488, (B) эндоцитоз трансферрина-Alexa546. Эксперименты были повторены не менее 5 раз с похожими результатами.

Исследование эндоцитоза при помощи иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии показало, что уже через 5 минут инкубации с лигандом, стабиллин-1 перемещался в маленькие везикулы, содержащие acLDL,

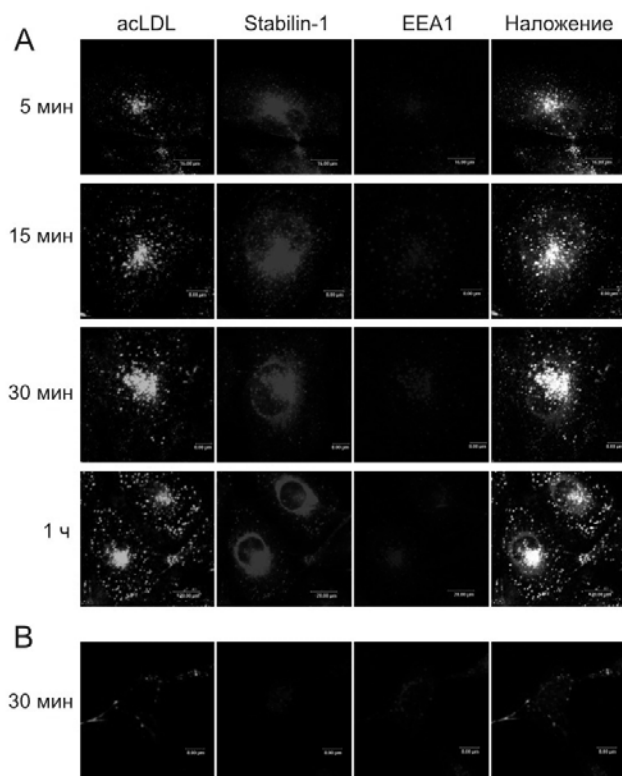


Рисунок 4. Стабилин-1 отвечает за транспорт acLDL в стабильно трансфицированных клетках CHO-K1. Клетки непрерывно инкубировали с лигандом в течение 5, 15 и 30 мин; в случае 1 часа, клетки инкубировали с лигандом в течение 20 мин, отмывали и продолжали инкубацию 40 мин в среде не содержащей acLDL. AcLDL-Alexa488 показан зеленым, стабилин-1 – красным, EEA1 – синим. Желтые участки показывают участки колокализации красного и зеленого. Розовые – колокализации красного и синего, голубые – колокализации зеленого и синего. Белые участки – результат колокализации всех трех цветов. (А) Транспорт acLDL в клетках CHO-stabilin-1. Выделяются многочисленные EEA1-негативные, но acLDL/стабилин-1 позитивные поздние эндосомы, распределенные в цитоплазме по периферии клетки в 1 часовом эксперименте. (В) Незначительное количество acLDL ассоциировано с клетками CHO-vector. Эксперимент был повторен 3 раза с похожим результатом.

Эти везикулы располагались на периферии клеток, в отличие от ранних эндосом, которые оставались в перинуклеарной области (Рис. 4). В контрольных клетках наблюдалось лишь незначительное количество acLDL связанного с поверхностью клеток.

На основании полученных данных можно заключить, что стабилин-1 отвечает за специфический эндоцитоз acLDL, а так же за его транспорт по эндосомальному пути.

Вортманнин вызывает накопление acLDL в ранних эндосомах

Для дальнейшего исследования механизма эндоцитоза с участием стабилина-1, было исследовано участие фосфоинозитол-3 киназы (PI3K) в эндоцитозе acLDL в клетках CHO. Обработка клеток ингибитором PI3K вортманнином приводила к изменению формы EEA1 позитивных ранних эндосом даже в отсутствии лиганда для эндоцитоза через стабилин-1. Уже через 15 мин обработки вортманнином, наряду с эндосомами нормальной морфологии, в клетках обнаруживались увеличенные слившиеся эндосомы. Этот эффект усиливался после 30 мин и 1 часа обработки.

Для того чтобы определить какой именно этап транспорта, регулируемого стабиллин-1, зависит от PI3K, клетки обрабатывали вортманнином за 30 минут до добавления в среду acLDL. Было обнаружено, что связывание и эндоцитоз acLDL не зависят от обработки клеток вортманнином. Через 30 мин после начала эндоцитоза, acLDL аккумулялировался в EEA1-позитивных эндосомах, которые так же содержали стабиллин-1. Этот же эффект наблюдался и в необработанных клетках. Однако, в клетках, обработанных вортманнином, стабиллин-1-положительные эндосомы, содержащие acLDL, были увеличены и имели неправильную форму. Некоторые из этих структур не содержали EEA1 или содержали очень незначительное его количество по сравнению с необработанными клетками. Наибольший эффект вортманнина наблюдался через час после начал эндоцитоза. Перенос acLDL и стабиллина-1 в поздние эндосомы был практически полностью блокирован. И стабиллин-1 и acLDL оставались в EEA1 положительных эндосомах в перинуклеарной области клетки. Эти результаты указывают на то, что активность PI3K необходима для транспорта acLDL из ранних эндосом в поздние.

Вортманнин влияет на локализацию стабиллина-1 в человеческих макрофагах

Ранее было показано, что стабиллин-1 присутствует в эндоцитозном компартименте в первичных человеческих макрофагах (Kzhyshkowska et al, 2004a). Поэтому было исследовано влияние вортманнина на внутриклеточное распределение стабиллина-1 в этих клетках. Было обнаружено, что вортманнин приводит к образованию как очень маленьких, так и увеличенных EEA1-позитивных везикул, в то время как интенсивность окраски практически не изменялось, указывая на то, что вортманнин не влияет на ассоциацию EEA1 с ранними эндосомами. Кроме того обработка вортманнином приводила к преимущественному накоплению стабиллина-1 в увеличенных эндосомах и приводила к снижению количества стабиллин-1-позитивных везикул.

Таким образом, было показано, что стабиллин-1 участвует в эндоцитозе и внутриклеточном транспорте acLDL в макрофагах. Активность PI3 киназы необходима для транспортировки acLDL из ранних в поздние эндосомы, а так же для нормального внутриклеточного распределения стабиллина-1 в первичных человеческих макрофагах второго типа.

Молекулярная гетерогенность популяции макрофагов второго типа

Исследования макрофагов второго типа, экспрессирующих стабиллин-1 указывают на то, что этот тип макрофагов обладает уникальными функциональными особенностями, которые обеспечиваются специфичным молекулярным репертуаром. Действительно, поиск маркеров моноцитов второго типа проведенный до 1999 года позволил описать АМАС-1 (Kodelja et al,

1998), маннозный рецептор (Stein et al, 1992) и CD163 (Hogger et al, 1998). Можно, однако, предположить, что функция макрофагов второго типа обеспечивается бóльшим числом специфично экспрессирующихся генов. Обнаружение этих генов и исследование их функций позволило бы лучше понять механизм развития макрофагов второго типа и их роль в функционировании здорового организма и в патологии. Поэтому в данной работе специфичный молекулярный репертуар макрофагов второго типа был исследован в различных условиях и с использованием различных экспериментальных подходов.

Поиск дифференциально экспрессирующихся генов

Сравнение молекулярного репертуара макрофагов стимулированных IL-4 и IFN γ было проведено при помощи субтрактивной гибридизации. В результате анализа более чем 20000 полученных клонов, была выявлена дифференциальная экспрессия генов фибронектина, β IG-H3 и ряда других генов, для которых активация IL-4 была описана ранее.

Анализ экспрессии фибронектина и β IG-H3 в макрофагах

Анализ экспрессии фибронектина и β IG-H3 проводился при помощи Нортерн блот гибридизации. Было показано, что экспрессия фибронектина повышена в макрофагах при стимуляции IL-4 (Рис. 5А дорожка 3). При использовании комбинации IL-4 и дексаметазона наблюдалась пониженная, по сравнению со стимуляцией IL-4, экспрессия фибронектина (Рис. 5А, дорожка 5). Анализ сплайсинга фибронектина показал, что IL-4 зависимое повышение экспрессии достигается прежде всего за счет активации экспрессии EDA-негативного варианта, характерного для заживающих ран и эмбрионального развития.

Структура экспрессии гена β IG-H3 отличался от структуры экспрессии фибронектина, прежде всего более существенной базальной экспрессией гена в контрольных клетках и клетках стимулированных IFN γ (Рис. 5В, дорожки 1, 2, 6 и 8). При этом, так же как и в случае с фибронектином, наблюдалась активация экспрессии гена при стимуляции макрофагов IL-4 (Рис. 5В дорожки 3 и 8) и ее подавление при стимуляции дексаметазоном (Рис. 5В, дорожки 4, 5, 9 и 10).

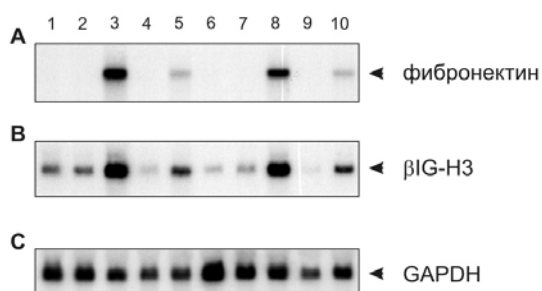


Рисунок 5. Анализ экспрессии мРНК фибронектина (А) и β IG-H3 (В) в различных популяциях макрофагов. В качестве контроля использована гибридизация с пробой к GAPDH (С). Макрофаги были стимулированы IFN γ (дорожки 2 и 7), IL-4 (дорожки 3 и 8), дексаметазоном (дорожки 4 и 9), IL-4 в комбинации с дексаметазоном (дорожки 5 и 10). РНК, полученная из контрольных макрофагов, нанесена в дорожках 1 и 6. Клетки культивировали 3 дня (дорожки 1-5) или 6 дней (дорожки 6-10).

Синтез компонентов внеклеточного матрикса и ферментов для его ремоделинга стимулируется IL-4 и подавляется дексаметазоном

Различия, обнаруженные при исследовании маркеров макрофагов второго типа при помощи субтрактивной гибридизации указывают на разницу в фенотипе между макрофагами, дифференцированными в присутствии IL-4 и дексаметазона. Для дальнейшего исследования различий между макрофагами стимулированными IL-4 (M2_{IL-4}) и глюкокортикоидом (M2_{ГК}) были выбраны компоненты внеклеточного матрикса и ферменты необходимые для его перестройки (матриксные металлопротеиназы и трансглутаминазы). При помощи количественной ПЦР было показано, что экспрессия мРНК гена *tenascin-C* повышена в M2_{IL-4} в 8 раз, по сравнению с контрольными макрофагами. Так же, как и в случае с фибронектином, дексаметазон подавлял экспрессию *tenascin-C* до уровня наблюдаемого в контрольных макрофагах (Рис. 6В).

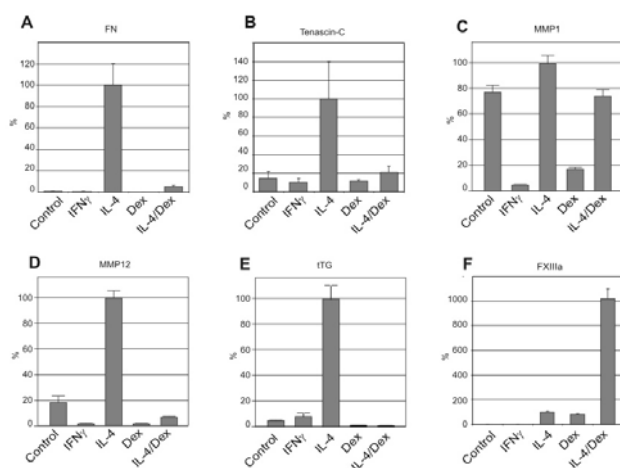


Рисунок 6. Анализ регуляции экспрессии компонентов внеклеточного матрикса и ферментов для его перестройки. Анализ экспрессии фибронектина (A), *tenascin-C* (B), матриксной металлопротеиназы 1 (C), матриксной металлопротеиназы 12 (D), тканевой трансглутаминазы (E), фактора коагуляции XIIIa (F) при помощи количественной ПЦР. Макрофаги культивировали в течение 6 дней при указанной стимуляции. Экспрессия генов при стимуляции IL-4 взята за 100%. Анализ экспрессии фактора коагуляции XIIIa Вестерн блоттингом (G).

Далее было показано, что IL-4 повышает экспрессию мРНК как MMP-1, так и MMP-12 (Рис. 6 С, D). При этом дексаметазон эффективно подавлял индуцированную IL-4 экспрессию MMP-12 (Рис. 6D), но не влиял на индуцированную IL-4 экспрессию MMP-1 (Рис. 6С). Стоит отметить, что обе металлопротеиназы экспрессировались в контрольных макрофагах, но отсутствовали в макрофагах, стимулированных IFN γ (M1) (Рис. 6С, D). Аналогично *tenascin-C* и MMP-12 экспрессия тканевой трансглутаминазы (tTG), основного источника трансглутаминазной активности макрофагов, повышалась примерно в 10 раз при стимуляции клеток IL-4. Как и ожидалось, эта стимуляция полностью нивелировалась дексаметазоном (Рис. 6Е). При этом экспрессия другой трансглутаминазы – фактора коагуляции XIIIa (FXIIIa) наиболее существенно активировалась комбинацией IL-4 и дексаметазона. Каждый из этих стимуляторов в отдельности приводил лишь к незначительному повышению уровня экспрессии (Рис. 6F). Таким образом, за исключением регуляции экспрессии FXIIIa, полученные результаты указывают на то, что IL-4 активирует продукцию различных компонентов внеклеточного матрикса, а так же ферментов для его перестройки. В то же время

глюкокортикоиды способны эффективно подавлять эту активацию, что согласуется с наблюдаемым в клинической практике подавляющим эффектом глюкокортикоидов на заживление ран.

IL-4 запускает, а глюкокортикоиды модулируют продукцию цитокинов макрофагами второго типа

Для дальнейшего описания различий между макрофагами, стимулированными IL-4 и дексаметазоном, были выбраны цитокины, продукция которых типична для макрофагов второго типа: AMAC-1, TARC и MCP-4. Для AMAC-1 ранее было показано, что его продукция активируется IL-4, но не дексаметазоном (Kodelja et al, 1998). Экспрессия TARC и MCP-4 описана для дендритных клеток, полученных из первичных моноцитов при стимуляции последних IL-4 (Hashimoto et al, 1999). Кроме того, было показано, что IL-4 стимулирует продукцию TARC и MCP-4 в клетках гладкой мускулатуры бронхов (Faffe et al, 2003) и клетках эпителия бронхов (Stellato et al, 1999). Анализ продукции цитокинов в культуральной среде показал, что IL-4 необходим для активации продукции всех исследованных цитокинов. В то же время дексаметазон оказался неспособен самостоятельно активировать продукцию этих цитокинов и лишь модулировал эффект IL-4. (Рис. 7).

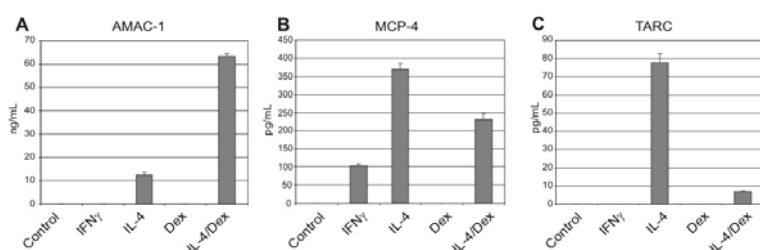


Рисунок 7. Анализ продукции цитокинов макрофагами через 6 дней культивирования. Концентрации цитокинов в культуральной среде были определены при помощи ELISA.

Глюкокортикоиды стимулируют фагоцитоз и экспрессию скавенджер-рецепторов

Исследование фагоцитарной активности различных популяций макрофагов показали, что стимуляция макрофагов дексаметазоном приводила к повышению фагоцитоза латексных шариков до 160% по сравнению с контрольными макрофагами, при этом IFN γ подавлял ее до 40%. IL-4 не оказывал существенного влияния на степень фагоцитоза, если использовался в одиночку, но незначительно снижал фагоцитарную активность простимулированную дексаметазоном (Рис. 8А). При использовании опсонизированных и неопсонизированных FITC-меченных бактерий *E.coli* были получены аналогичные результаты (Рис. 8В). Наблюдавшаяся разница в фагоцитарной активности может быть объяснена разницей в спектре экспрессии скавенджер рецепторов. При помощи количественной ПЦР было показано, что дексаметазон существенно повышает уровень экспрессии hMARCO

и CD163 (Рис. 8С, Е). Экспрессия макрофагального маннозного рецептора (MMR) повышалась под воздействием как IL-4, так и дексаметазона. При использовании комбинации IL-4 и дексаметазона обнаруживался синергизм действия этих двух факторов (Рис. 8D).

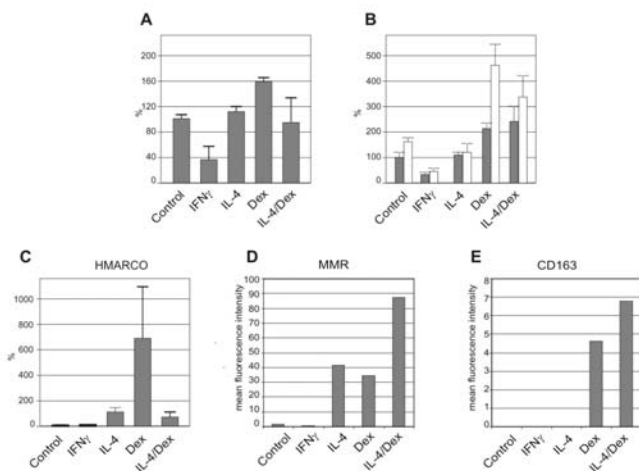


Рисунок 8. А-В: Фагоцитоз латексных шариков (А) неопсонизированных (закрашенные столбцы) и опсонизированных (незакрашенные столбцы) бактерий *E.coli* (В) различными типами макрофагов. Фагоцитоз латексных шариков (А) или не опсонизированных бактерий *E.coli* (В) контрольными макрофагами взят за 100%. Все эксперименты повторены не менее 5 раз. С: Анализ экспрессии hMARCO при помощи количественной ПЦР. Экспрессия в макрофагах, стимулированных IL-4, взята за 100%. D,E: Анализ экспрессии MMR (D) и CD163 (E) при помощи проточной цитометрии. Эксперименты были повторены не менее 3 раз с похожим результатом.

Таким образом, было показано, что различные стимуляторы, способные вызвать дифференцировку макрофагов второго типа не обязательно приводят к экспрессии одинаковых маркеров и одинаковой функциональной активности. Эти данные позволяют предположить, что каждый цитокин или гормон, способный воздействовать на моноциты/макрофаги, приводит к развитию специфичного для него фенотипа макрофагов.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛАСТИЧНОСТИ МАКРОФАГАЛЬНОГО ФЕНОТИПА

Анализ пластичности макрофагов и их способности реагировать на изменяющееся микроокружение неотделим от понимания механизма взаимодействия между врожденным и приобретенным иммунитетом. На данном этапе работы была исследована способность макрофагов поляризованных в Th1 или Th2 среде, отвечать на вторичные про- или противовоспалительные сигналы.

Анализ экспрессии рецепторов к цитокинам на Th1/Th2 поляризованных макрофагах

Исследование зависимости экспрессии рецепторов макрофагов от типа стимуляции показали, что как M2_{IL-4} так и M1_{IFN γ} экспрессируют сравнимые количества IFN γ RI. Экспрессия IFN γ RI была незначительно повышена на поверхности макрофагов, стимулированных IL-4 в комбинации с дексаметазоном (M2_{IL-4/ГК}) (Рис. 9). Экспрессия IL-4R α определялась только на поверхности контрольных макрофагов и M1_{IFN γ} (Рис. 9).

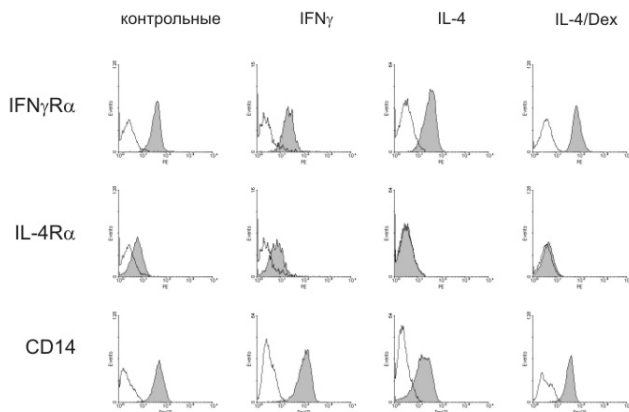
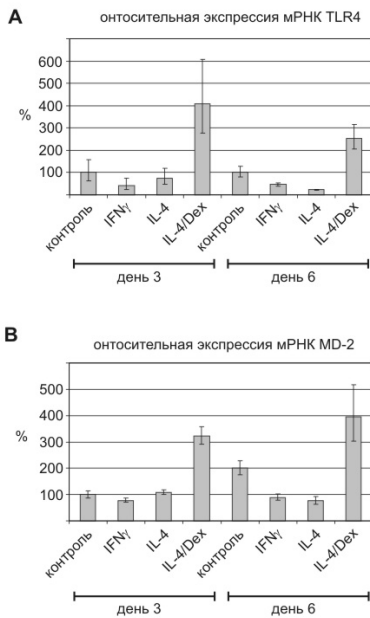


Рисунок 9. Анализ экспрессии IL-4Rα, IFNγRI и CD14 на поверхности макрофагов на 3-й день культуры.

Исследование рецепторов, участвующих в узнавании LPS выявило снижение поверхностной экспрессии CD14 на поверхности M2_{IL-4}. Все остальные исследованные популяции макрофагов экспрессировали похожие количества

рецепторов, участвующих в узнавании LPS выявило снижение поверхностной экспрессии CD14 на поверхности M2_{IL-4}. Все остальные исследованные популяции макрофагов экспрессировали похожие количества

CD14 (Рис. 9). Экспрессия TLR4 и MD2 была проанализирована на уровне мРНК при помощи количественной ПЦР. Анализ показал, что количество транскриптов TLR4 повышено в случае M2_{IL-4/ГК} (Рис. 10А). Аналогично дексаметазон усиливал экспрессию мРНК гена MD2. M1_{IFNγ} и M2_{IL-4} практически не отличались по уровню экспрессии мРНК TLR4 и MD2 (Рис. 10В).



не отличались по уровню экспрессии мРНК TLR4 и MD2 (Рис. 10В).

Рисунок 10. Анализ экспрессии мРНК TLR4 и MD2 при помощи количественной ПЦР. Макрофаги стимулировали 3 и 6 дней как указано, после чего анализировали экспрессию TLR4 (А) и MD-2 (В). Все эксперименты были повторены не менее 3 раз.

Анализ экспрессии внутриклеточного сенсора MDP - NOD2 так же был проведен на уровне мРНК. Количественная ПЦР показала, что количество транскриптов NOD2 не зависит от стимуляции макрофагов.

Исходя из полученных данных, был сделан вывод, что способность макрофагов распознавать про- или противовоспалительные сигналы не зависит от условий их дифференцировки. При этом

дексаметазон влияет не экспрессию системы рецепторов, отвечающих за распознавание патогена.

Производство противовоспалительных цитокинов активируется при вторичной стимуляции Th2-ассоциированными цитокинами и глюкокортикоидами

Для анализа ответа различных популяций макрофагов на стимуляцию Th2-цитокинами, были выбраны следующие маркеры: АМАС-1 (CCL18) и антагонист рецептора к IL-1 (IL-1ra). Различные популяции макрофагов стимулировали IL-4, IL-4/ГК или IL-10 и определяли концентрации АМАС-1 и IL-1ra при помощи ELISA.

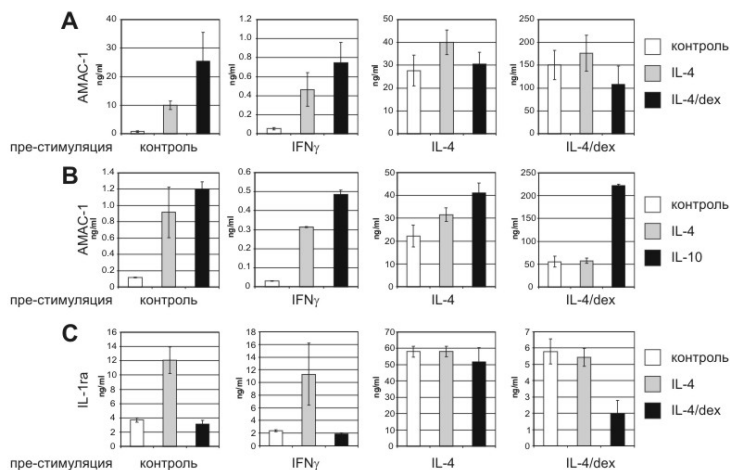


Рисунок 11. Анализ продукции АМАС-1 и IL-1ra Макрофаги, престаимулированные в течение 6 дней стимулировали, как указано на рисунке. Концентрации АМАС-1 (А и В) и IL-1ra (С) измеряли в культуральной среде при помощи ELISA. Эксперимент был повторен не менее 3 раз.

Во всех популяциях макрофагов была обнаружена продукция АМАС-1. IL-4 эффективно активировал продукцию АМАС-1 в клетках, которые не производили его в результате первичной стимуляции – контрольных и стимулированных

IFN γ макрофагах (Рис. 11А). При использовании для вторичной стимуляции IL-10 было обнаружено, что IL-10 способен не только активировать продукцию АМАС-1 в M1_{IFN γ} и нестимулированных макрофагах, но и усиливать продукцию АМАС-1 в M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} (Рис. 11). Следует отметить, что, несмотря на очевидную активацию Th2 цитокинами и дексаметазоном продукции АМАС-1 в макрофагах первого типа - M1_{IFN γ} и контрольных макрофагах, эффективность этой продукции была существенно ниже, чем в макрофагах второго типа. Так же как и в случае с АМАС-1, IL-4 был способен активировать эффективную продукцию IL-1ra контрольных макрофагах и M1_{IFN} (Рис. 11).

Зрелые макрофаги производят провоспалительные цитокины в ответ на бактериальные продукты, но не Th1 цитокин IFN-gamma

Для исследования способности зрелых макрофагов отвечать на вторичные провоспалительные стимулы, в качестве индикаторов эффективного ответа были выбраны провоспалительные цитокины TNF и IL-1 β , и Th1 цитокин IL-12. Для вторичной стимуляции использовали мурамил-дипептид (MDP), липополисахарид (LPS) и Th1 цитокин IFN γ . Несмотря на то, что при первичной стимуляции моноцитов IFN γ наблюдается продукция значительных количеств TNF и IL-1 β , в зрелых макрофагах IFN γ оказался неспособным активировать продукцию этих цитокинов (Рис. 12А, В).

Способность зрелых макрофагов реагировать на бактериальные продукты была исследована в тех же экспериментальных условиях. Эксперимент показал, что M1_{IFN γ} и M2_{IL-4} производят сравнимые количества TNF (Рис. 12А). Существенно меньшие, но измеряемые количества TNF производились M2_{IL-4/ГК} и контрольными макрофагами (Рис. 12А). На основании этих данных можно утверждать, что, независимо от стимуляции, зрелые макрофаги сохраняют способность отвечать на стимуляцию липополисахаридом, производя TNF. Похожим образом, стимуляция липополисахаридом приводила к продукции IL-

1 β во всех популяциях макрофагов. Исследование экспрессии мРНК IL-12p40 проводилось при помощи количественной ПЦР. Было показано, что наиболее эффективно липополисахарид активировал экспрессию IL-12p40 в контрольных макрофагах (Рис. 12С). M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} экспрессировали меньшие количества IL-12p40, в то время как в M1_{IFN γ} экспрессия мРНК IL-12p40 вообще не была активирована LPS (Рис. 12С).

Кроме липополисахарида способность стимулировать воспалительный ответ в зрелых макрофагах была исследована для мурамил-дипептида (MDP) – синтетического аналога компонента бактериальной стенки. Так же как и LPS, MDP эффективно активировал продукцию TNF и IL-1 β в M1_{IFN γ} . Значительно более слабым был эффект MDP на контрольные макрофаги и M2_{IL-4}. В случае же с макрофагами, стимулированными IL-4 в комбинации с дексаметазоном, MDP был неспособен активировать продукцию цитокинов.

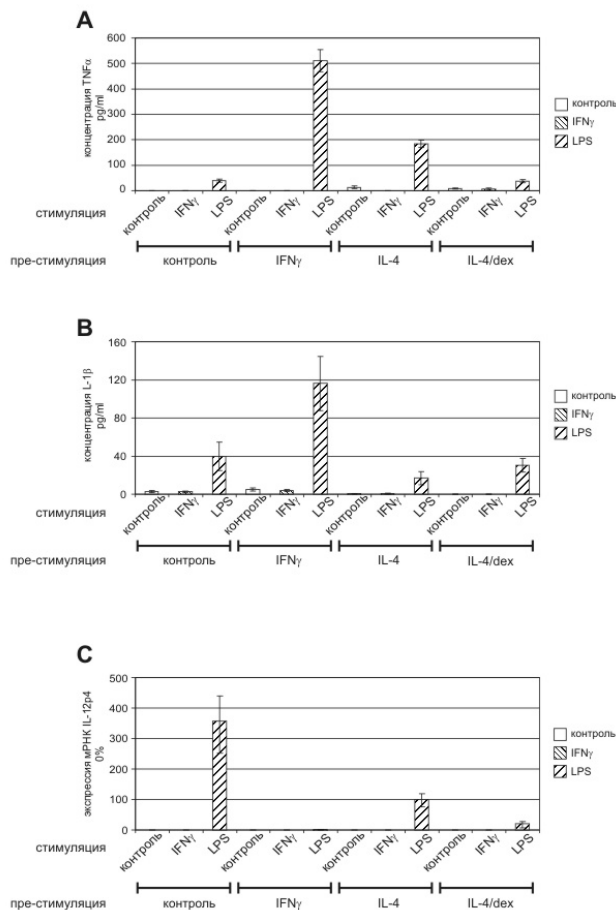


Рисунок 12. LPS активует продукцию TNF и ИЛ-1 β и экспрессию мРНК IL-12p40. Макрофаги престабилировали в течение 6 дней и стимулировали IFN γ или LPS в течение 6 часов. Продукция TNF (A) и IL-1 β (B) была исследована в культуральной среде при помощи ELISA. Экспрессию мРНК IL-12p40 (C) исследовали при помощи количественной ПЦР в макрофагах стимулированных IFN γ или LPS в течение 2 часов. Эксперимент был повторен не менее 3 раз.

Полученные данные указывают на то, что зрелые макрофаги способны эффективно реагировать на внешние провоспалительные стимулы. При этом тип дифференцировки определяет степень ответа и спектр производимых цитокинов.

Кинетика продукции цитокинов

Разница в пре-стимуляции может приводить к феномену, когда одна и та же вторичная стимуляция использует различные пути передачи сигнала для достижения одного и того же эффекта. Однако, как правило, различные пути

передачи сигнала, различаются по скорости и, как следствие, по кинетике ответа. Исходя из этого было предположено, что если продукция цитокинов регулируется различными сигнальными путями, то можно ожидать разницы в кинетике этих процессов. Для проверки этой гипотезы кинетика продукции цитокинов AMAC-1 и TNF α были исследованы при вторичной стимуляции

макрофагов IL-4 и LPS соответственно. Кинетику продукции цитокинов исследовали на протяжении 48 часов непрерывной стимуляции. Было обнаружено, что кинетики продукции AMAC-1 и TNF одинаковы для всех типов зрелых макрофагов (Рис. 13). Эти данные указывают на то, что макрофаги, престаимулированные IFN γ или IL-4, скорее всего, используют один и тот же молекулярный механизм для ответа на Th2 цитокины или бактериальные продукты, а тип пре-стимуляции определяет только степень продукции цитокинов.

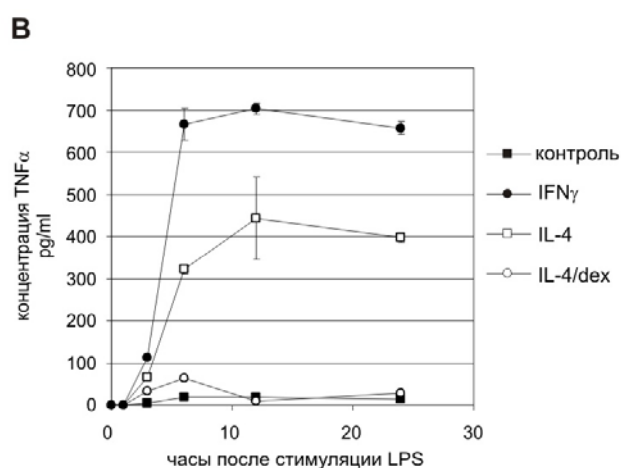
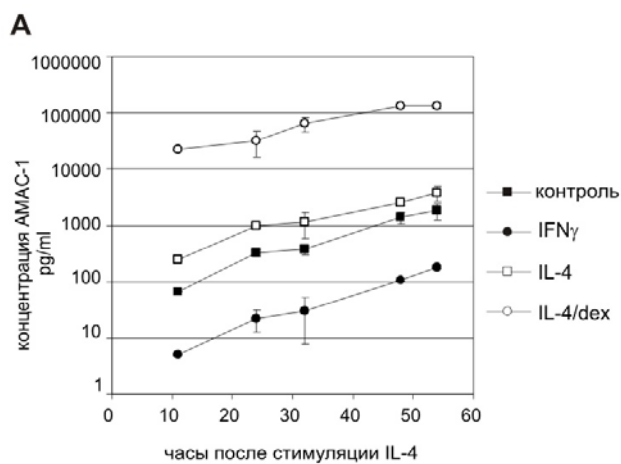


Рисунок 13. Кинетика продукции AMAC-1 и TNF. Макрофаги престаимулировали 6 дней и стимулировали IL-4 (А) или LPS (В) как указано. Концентрации AMAC-1 (А) и TNF α (В) измеряли в культуральной среде при помощи ELISA. Все эксперименты были повторены 3 раза.

Анализ фагоцитозной активности макрофагов после вторичной стимуляции

Так как макрофаги второго типа проявляют более высокую фагоцитарную активность, чем макрофаги первого типа, было исследовано влияние вторичной стимуляции на фагоцитарную активность зрелых макрофагов (Gratchev et al, 2005). Проточная цитометрия позволила обнаружить, что уже после 24 часов, стимуляция макрофагов второго типа IFN γ приводила к значительному снижению фагоцитарной активности

M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} (Рис. 14), в то время как IL-4 и IL-4/дексаметазон не оказывали существенного влияния на контрольные макрофаги или M1_{IFN γ} (Рис. 14). Незначительное, но статистически значимое увеличение фагоцитарной активности M1_{IFN γ} при вторичной стимуляции макрофагов IL-4 и IL-4/дексаметазон наблюдалось через 5 дней стимуляции (Рис. 14).

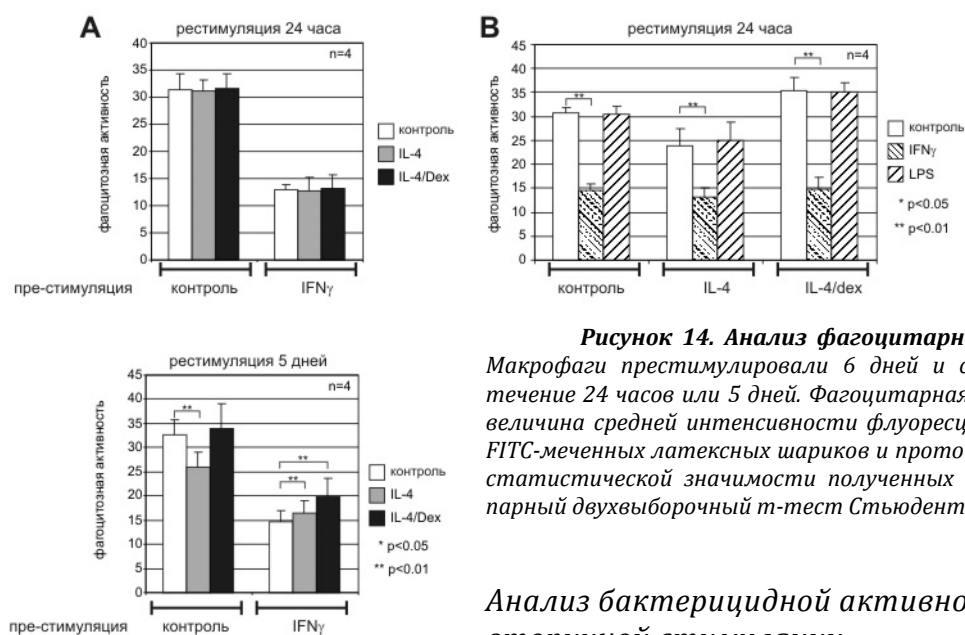


Рисунок 14. Анализ фагоцитарной активности макрофагов. Макрофаги престаимулировали 6 дней и стимулировали, как указано в течение 24 часов или 5 дней. Фагоцитарная активность определялась как величина средней интенсивности флуоресценции, полученная при помощи FITC-меченных латексных шариков и проточной цитометрии. Для анализа статистической значимости полученных результатов был использован парный двухвыборочный *t*-тест Стьюдента.

Анализ бактерицидной активности макрофагов после вторичной стимуляции

В отличие от макрофагов второго типа, макрофаги первого типа способны более эффективно уничтожать патогены (Gratchev et al, 2001b). Поэтому, далее была исследована способность зрелых макрофагов изменять свою бактерицидную активность под действием Th1 и Th2 цитокинов и бактериальных продуктов. Было обнаружено, что стимуляция макрофагов IL-4 или его комбинацией с дексаметазоном приводила к 10-и кратному снижению бактерицидной активности контрольных макрофагов и M1_{IFN γ} (Рис. 15). При этом стимуляция макрофагов IFN γ приводила к 15-20-кратному повышению бактерицидной активности контрольных макрофагов, M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} (Рис. 15). Стоит особо отметить, что LPS не влиял ни на фагоцитарную, ни на бактерицидную активность макрофагов (Рис. 14, 15). Можно сделать вывод, что LPS активизирует, прежде всего, цитокиновый ответ макрофагов, но не изменяет функциональное состояние клеток. Обратное справедливо для IFN- γ , который изменяет функциональное состояние клетки, но не активизирует продукцию цитокинов.

Таким образом, было показано, что стимуляция зрелых M1_{IFN γ} Th2 цитокинами приводит к активации продукции противовоспалительных цитокинов, увеличивает фагоцитарную и снижает бактерицидную активность. В то же время IFN γ активно стимулирует бактерицидную и снижает фагоцитарную активность M2, не активируя продукции цитокинов. Бактериальные продукты, такие как LPS и MDP способны активировать все популяции макрофагов. Эти данные указывают на то, что зрелые макрофаги способны адекватно реагировать на широкий спектр эндогенных и экзогенных стимулов независимо от первоначальной стимуляции.

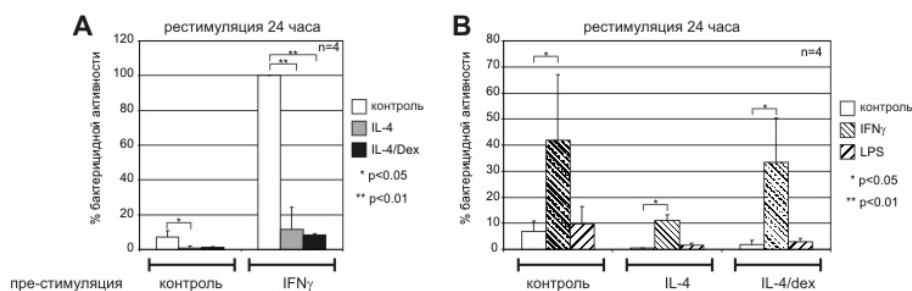


Рисунок 15. Анализ бактерицидной активности макрофагов. Макрофаги престоимировали 6 дней и стимулировали, как указано. Бактерицидная активность определялась, как описано в материалах и методах. В каждом эксперименте бактерицидная активность

$M1_{IFN\gamma}$ была взята за 100%. Для анализа статистической значимости полученных результатов был использован парный двухвыборочный *t*-тест Стьюдента.

Накопленные знания позволяют утверждать, что макрофаги в организме человека нельзя разделить на 2 категории: классически и альтернативно активированные. Скорее, систему мононуклеарных фагоцитов можно представить в виде континуума функциональных состояний, на одном из полюсов которого находятся макрофаги, активно восстанавливающие ткань после подавления воспалительной реакции, а на другом – макрофаги, активно стимулирующие воспаление. Нейтральное состояние, соответствующее здоровой неповрежденной ткани будет находиться между этих 2-х полюсов (Рис. 16) (Gratchev et al, 2005; Gratchev et al, 2006).

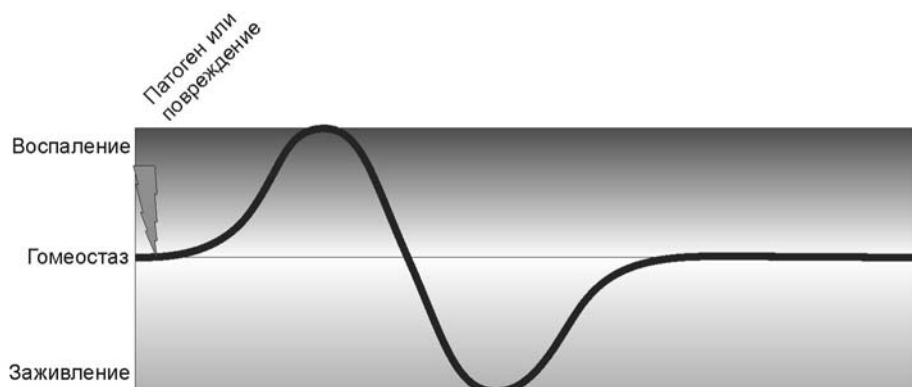


Рисунок 16. Изменение фенотипа макрофагов в процессе воспалительной реакции.

Разнообразие макрофагальных фенотипов объясняется не только различными комбинациями факторов, воздействующих на клетку, но также и последовательностью воздействия этих факторов. Так было показано, что макрофаги, обработанные $IFN\gamma$ за несколько часов до стимуляции липополисахаридом, были способны производить большие количества TNF (Hayes et al, 1995a), кроме того обработка $IFN\gamma$ ведет к изменению ответа на IL-10 (Herrero et al, 2003). Способность макрофагов отвечать на различные стимулы независимо от фенотипа и степени дифференцировки привела к созданию концепции пластичности макрофагального фенотипа (Gratchev et al, 2006; Stout and Suttles, 2004). В соответствии с этой концепцией макрофаги рассматриваются как клетки, обладающие способностью изменять свое

состояние в пределах континуума возможных состояний в зависимости от изменений, произошедших в их микроокружении среде. Так независимо от фенотипа макрофаги способны адекватно ответить на молекулярные структуры патогенов (PAMPs от «pathogen association molecular patterns») такие как LPS или MDP. Также макрофаги, участвующие в стимуляции воспалительной реакции, способны ответить на противовоспалительные сигналы и понизить свой воспалительный потенциал (Gratchev et al, 2006).

Анализ IL17BR – маркера макрофагов второго типа

IL-17E (IL-25) принадлежит к семейству цитокинов IL-17, которое включает 5 белков с уровнем белковой гомологии от 20 до 50%. В отличие от остальных членов семейства, IL-17E вызывает экспрессию Th2 ассоциированных цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13 (Fort et al, 2001). IL-17E производится субпопуляцией Th2 поляризованных Т-клеток (Fort et al, 2001), а так же тучными клетками (Ikeda et al, 2003). В мышинной модели повышенная продукция IL-17E приводила к развитию Th2-патологий, эозинофилии легких (Hurst et al, 2002), и повышенной продукции слизи в легких и пищеварительном тракте (Fort et al, 2001; Pan et al, 2001). Рецептор к IL-17E был первоначально описан как рецептор к IL-17B, откуда и появилось название IL-17RB (Shi et al, 2000). Другие наименования этого рецептора - IL-17 receptor homolog 1 (IL-17Rh1) (Lee et al, 2001) и EVI27 (Tian et al, 2000).

Наши первичные данные указывали на то, что стимуляция макрофагов IL-4 приводит к активации экспрессии IL-17RB. Поэтому был поставлен вопрос о спектре цитокинов, влияющих на экспрессию этого рецептора и о возможности использования его как маркера определенной популяции макрофагов.

Анализ экспрессии IL-17BR в M1, M2_{IL-4} и M2_{IL-4/TGFβ} показал, что в макрофагах стимулированных IL-4 экспрессия мРНК IL-17BR в среднем в 10 раз выше, чем в макрофагах, стимулированных IFNγ (M1). Эта экспрессия усиливалась при добавлении к IL-4 трансформирующего фактора роста бета (TGFβ). Далее было исследовано, каким образом другие Th2 ассоциированные цитокины (IL-10, IL-13 и TGFβ) или глюкокортикоиды влияют на экспрессию IL-17BR. Количественная ПЦР показала, что IL-13, подобно IL-4 активирует экспрессию IL-17BR, хотя и не усиливает эффект IL-4 (Рис. 17). Дексаметазон подавлял экспрессию IL-17BR активированную IL-4 (Рис. 17). IL-10 сам по себе не был способен активировать экспрессию рецептора, но несколько усиливал эффект IL-4. Наиболее сильный эффект наблюдался в случае TGFβ, который существенно усиливал эффект IL-4, хотя будучи использован сам по себе был неспособен активировать экспрессию рецептора (Рис. 17). При этом экспрессия IL-17BR, наблюдавшаяся в почках - органе, с высоким уровнем эндогенной

экспрессии IL-17BR (Shi et al, 2000), была сравнима с экспрессией в макрофагах, стимулированных IL-4 или IL-13 (Рис. 17). Данные полученные на уровне мРНК были подтверждены данными Вестерн блоттинга (Рис. 18С).

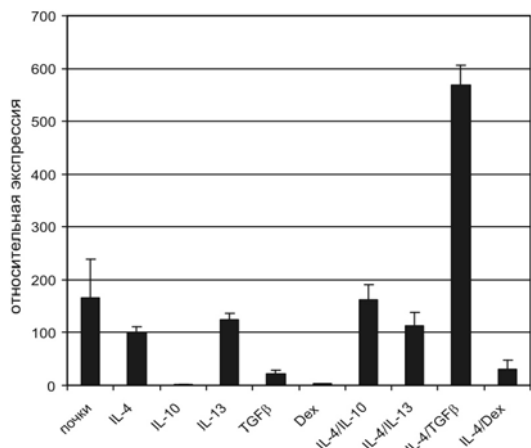
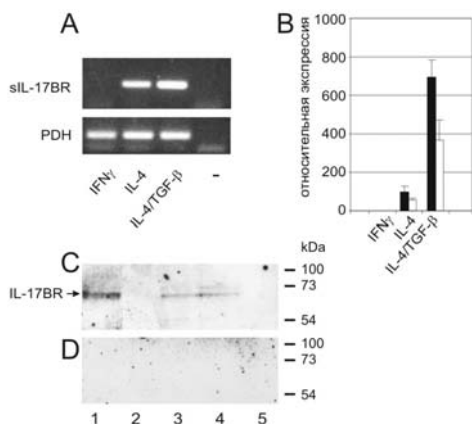


Рисунок 17. Анализ экспрессии IL-17BR методом количественной ПЦР. Макрофаги культивировали 6 дней в присутствии указанных цитокинов и/или дексаметазона. Экспрессия IL-17BR в M2_{IL-4} была взята за 100%. Представлены средние величины, полученные по результатам 3 экспериментов.

Анализ сплайс-вариантов IL-17BR

Анализ базы данных EST выявил наличие нескольких возможных сплайс-вариантов мРНК IL-17BR (Moseley et al, 2003) соответствующих мембран-связанной и растворимой формам рецептора. Экспрессию растворимой формы IL-17BR - sIL-17BR исследовали при помощи ПЦР, с праймерами расположенными внутри 8-го интрона. Эксперимент показал, что sIL-17BR экспрессируется в макрофагах, стимулированных IL-4 и IL-4 в комбинации с TGFβ (Рис. 18А). С помощью количественной ПЦР было измерено общее количество транскриптов IL-17BR и отдельно количество транскриптов IL-17BR кодирующих мембрансвязанную форму рецептора. Оказалось, что



мембрансвязанные транскрипты IL-17BR составляют примерно 70% от общего количества транскриптов, и это соотношение не зависит от стимуляции макрофагов (Рис. 18В).

Рисунок 18. Анализ сплайс-вариантов мРНК и экспрессии белка IL-17BR в макрофагах. А. Анализ экспрессии мРНК, кодирующей растворимую форму IL-17BR, при помощи ПЦР. В. Анализ экспрессии тотальной мРНК IL-17BR (закрашенные столбики) и мРНК, кодирующей мембранную форму IL-17BR (незакрашенные столбики). С, D. Анализ экспрессии белка IL-17BR в различных макрофагах. Дорожка 1: клетки CHO-K1 трансфицированные плазмидой экспрессирующей hIL-17BR; дорожка 2: M1_{IFNγ}; дорожка 3: M2_{IL-4}; дорожка 4: M2_{IL-4/TGFβ}; дорожка 5: клетки CHO-K1, трансфицированные вектором.

Таким образом, подводя итоги этой части работы можно утверждать, что предложенная ранее система дихотомии макрофагальных фенотипов не отражает реальной ситуации. А именно, стимуляция макрофагов IL-4 приводит к

повышению их способности перестраивать внеклеточный матрикс и производить цитокины, которые влияют на инфильтрацию клеток иммунной системы. При этом глюкокортикоиды в терапевтических концентрациях приводят к подавлению способности макрофагов перестраивать внеклеточный матрикс, но стимулируют их способность фагоцитировать как опсонизированный, так и неопсонизированный материал. Это свойство макрофагов объясняется повышением экспрессии скавенджер-рецепторов. Анализ эффектов других иммуносупрессорных факторов показал, что каждый из них способен вызывать строго индивидуальный спектр реакций макрофагов. Так маркером стимуляции макрофагов трансформирующим фактором роста бета (TGF β) является повышенная экспрессия IL-17BR. На основании этих данных можно утверждать, что популяция макрофагов в человеческом организме высоко гетерогенна и определяется цитокинами, ростовыми факторами и гормонами, характерными для той или иной ткани или органа.

Высокая гетерогенность макрофагов ставит вопрос о биологической целесообразности существования подобной популяции клеток и о способности этих клеток менять свои свойства в зависимости от изменения внешних условий. Кроме того, вопрос о пластичности макрофагального фенотипа неотделим от разработки терапевтических подходов. Во-первых, его нужно учитывать при разработке цитокиновых и гормональных терапий, так как при подобной терапии тканевые макрофаги могут приобрести нежелательные свойства, а во-вторых, при разработке терапий направленных непосредственно на изменение фенотипа макрофагов при таких заболеваниях, как опухоли или хронические воспаления.

В организме макрофаги сталкиваются с непрерывно изменяющимся набором сигналов, включающем многочисленные факторы, такие как цитокины, гормоны, сигналы от клеток ткани и патогены. Однако большинство экспериментальных систем используют всего лишь один стимул или простую статичную комбинацию стимулов. В последние годы все чаще стали появляться работы, указывающие на необходимость исследования последовательной стимуляции макрофагов, так как она необходима для формирования адекватной реакции. Данные работы обсуждаются в обзоре Стаута и Саттелс (Stout and Suttles, 2004). Так, было показано, что предварительная обработка макрофагов IFN γ необходима для эффективной продукции TNF в ответ на стимуляцию липополисахаридом (Hayes et al, 1995b), та же обработка позволяет изменить ответ макрофагов на стимуляцию IL-10 (Herrero et al, 2003; Hu et al, 2002). Обработка макрофагов IL-4 перед стимуляцией липополисахаридом избирательно влияет на эффективность продукции TNF и IL-1 α (D'Andrea et al,

1995; Major et al, 2002). Однако наиболее яркая зависимость от последовательности стимулов это полное инвертирование провоспалительного иммунного ответа в ответ на липополисахарид при предварительной обработке макрофагов иммунными комплексами (Anderson and Mosser, 2002; Gerber and Mosser, 2001; Grazia et al, 2001). Эти данные хорошо согласуются с результатами, описанными в представленной работе.

АКТИВАЦИЯ МАКРОФАГОВ ТРАНСФОРМИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ РОСТА БЕТА

В то время, как эффекты различных противовоспалительных цитокинов на макрофаги подвергаются изучению в различных лабораториях, эффект трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) на зрелые макрофаги практически не изучен. TGF- β это многофункциональный фактор роста, обладающий противовоспалительным эффектом. TGF- β действует на клетку через рецепторный комплекс, состоящий из 2 димеров, включающих рецепторы I и II типов, представляющие собой серинтреониновые протеинкиназы. Связывание TGF- β с рецептором приводит к активации TGF β RII, который фосфорилирует и активирует TGF β RI (De Caestecker, 2004). Активированный TGF β RI передает сигнал внутрь клетки за счет фосфорилирования рецептор-регулируемых (R-Smad) Smad2 и Smad3. Активированные R-Smad образуют гетеротример со Smad4 и транслоцируются в ядро. В ядре комплекс Smad связывается со Smad-связывающимся элементом в промоторах генов, что приводит к активации транскрипции. Способность клетки отвечать на белки из семейства трансформирующего фактора роста бета определяется спектром и количеством соответствующих рецепторов, экспрессирующихся на ее поверхности.

Основной причиной отсутствия исследований влияния TGF- β на макрофаги явилась серия работ, указывающих на то, что макрофаги теряют рецептор к TGF- β в процессе дифференцировки (Ashcroft, 1999; Brandes et al, 1991; Li et al, 2006; Wong et al, 1991). Однако, наблюдавшийся ранее эффект TGF- β на уровень экспрессии мРНК IL-17BR (Gratchev et al, 2004) позволил предположить, что в определенных условиях макрофаги сохраняют способность отвечать на этот цитокин. Физиологическое значение этой способности макрофагов трудно переоценить, так как зрелые макрофаги подвергаются воздействию TGF- β в таких серьезных патологических ситуациях как злокачественные опухоли и атеросклероз. В случае опухоли макрофаги находятся в среде содержащей комбинацию цитокинов, производимых опухолевыми клетками и инфильтрирующими клетками иммунной системы. В случае атеросклеротической бляшки цитокины, воздействующие на макрофаги, производятся клетками интимы и клетками иммунной системы,

инфильтрирующими бляшку. Комбинация IL-4 и TGF- β часто наблюдается как в опухолях, так и при атеросклерозе. Поэтому для исследования воздействия TGF- β на зрелые макрофаги были выбраны макрофаги второго типа, дифференцировавшиеся в присутствии IL-4 (M2_{IL-4}) и IL-4 в комбинации с глюкокортикоидом дексаметазон (M2_{IL-4/ГК}).

TGF- β 1 активировывает экспрессию IL-17BR не только в моноцитах, но и в зрелых макрофагах второго типа

Для описания эффекта TGF- β 1 на макрофаги, эксперимент был построен следующим образом: макрофаги дифференцировались в присутствии IL-4 или IL-4 в комбинации с дексаметазоном в течение 5 дней, после чего клетки стимулировали TGF- β 1. Так как TGF- β 1-зависимый сигналинг достаточно быстрый процесс (Schmieger and Hill, 2005), то экспрессия мРНК IL-17BR была исследована через 3 и 24 часа после начала стимуляции (Рис. 19). Результаты количественной ПЦР показали отсутствие эффекта TGF- β 1 на экспрессию мРНК IL-17BR через 3 часа стимуляции. Через 24 часа стимуляции статистически достоверное 5-и кратное увеличение экспрессии наблюдалось в случае M2_{IL-4/ГК}, в то время как 2-х кратное увеличение экспрессии в случае M2_{IL-4} не было статистически достоверным. Полученные результаты указывают на то, что зрелые макрофаги сохраняют способность отвечать на стимуляцию TGF- β 1, причем M2_{IL-4/ГК} обладают этой способностью в большей степени, чем M2_{IL-4}.

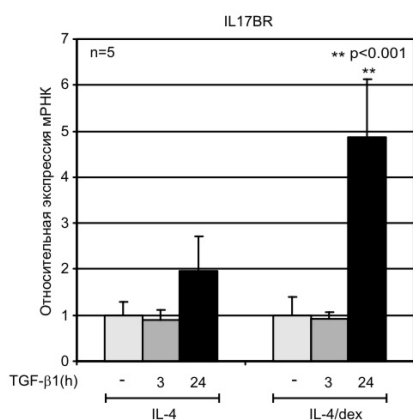


Рисунок 19. Анализ способности TGF- β 1 усилить экспрессию мРНК IL17BR в зрелых макрофагах. Макрофаги дифференцировались в присутствии IL-4 или IL-4 в комбинации с дексаметазоном в течение 5 дней. Далее макрофаги стимулировали TGF- β 1 как указано. Экспрессию мРНК IL17BR исследовали при помощи количественной ПЦР. Экспрессия в M2_{IL-4} на 5 день взята за 1.

Анализ дифференциальной экспрессии генов в зрелых макрофагах, стимулированных TGF- β 1

Так как для M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} была обнаружена разница в ответе на TGF- β 1, далее был исследован весь спектр генов, активируемых в этих клетках TGF- β 1. Макрофаги, полученные, так же как и для предыдущего эксперимента, стимулировали TGF- β 1 в течение 24 часов и использовали для выделения РНК, которая была исследована при помощи биочипов фирмы Affymetrix. Для получения статистически достоверных данных в эксперименте были использованы макрофаги от 5 различных доноров. Исследование дифференциальной экспрессии генов не выявило статистически достоверных различий между M2_{IL-4} и M2_{IL-4} стимулированными TGF- β 1 (Рис. 20). Этот результат подтверждал

данные, полученные при анализе эффекта TGF- β 1 на экспрессию мРНК IL-17BR (Рис. 19), а так же данные других групп, где сообщалось, что зрелые макрофаги не способны эффективно отвечать на TGF- β 1 (Ashcroft, 1999). Однако, в M2_{IL-4/ГК} стимуляция TGF- β 1 приводила к 4-х кратному и более повышению экспрессии более чем 90 генов ($p < 0.000001$) (Рис. 20). Основываясь на полученных данных, дальнейшие исследования были сконцентрированы на M2_{IL-4/ГК}. Для получения данных о генах, напрямую активируемых TGF- β 1, при помощи биочипов были также проанализированы M2_{IL-4/ГК} стимулированные TGF- β 1 в течение 3-х часов. Анализ дифференциальной экспрессии генов в M2_{IL-4/ГК} стимулированных TGF- β 1 в течение 3 и 24 часов, позволил выявить 2 группы генов, отличающихся по времени активации. Группа генов «раннего ответа» содержала 44 гена, экспрессия которых была усилена в 4 и более раз уже через 3 часа после стимуляции. Группа «позднего ответа» содержала 90 генов, экспрессия которых была усилена в 4 и более раз через 24 часа после стимуляции. 23 гена попали в обе группы. Полученных данные указывают на то, что TGF- β 1 активирует сложную программу регуляции транскрипции, и наблюдаемые эффекты содержат как непосредственные эффекты TGF- β 1 на экспрессию генов, так и вторичные, включающие пути передачи сигнала, использующие факторы, экспрессия которых активировалась TGF- β 1 (Li et al, 2006).

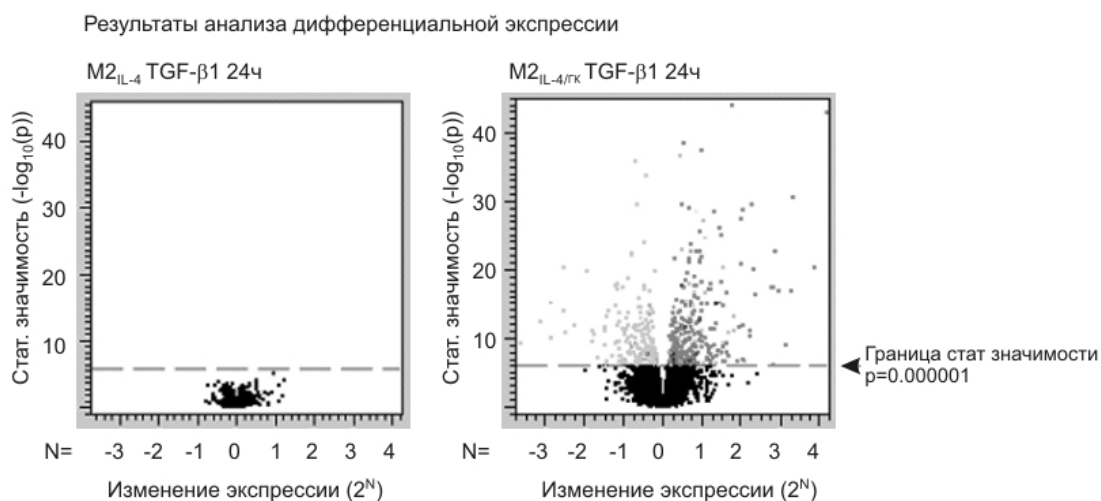


Рисунок 20. Анализ дифференциальной экспрессии генов при помощи биочипов фирмы Affymetrix.

Таблица 1. Функциональные группы генов, экспрессия которых увеличивалась при стимуляции TGF- β 1 не менее чем в 4 раза (FC \geq 2)

AffyID	Gene_Title	FC 3h vs. Control	FC 24h vs. Control	FC 24h vs. 3h
Регуляция транскрипции				
207826_s_at	ID3: inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	10.0	6.9	0.7
214445_at	ELL2: elongation factor, RNA polymerase II, 2	2.5	2.6	1.0
204253_s_at	VDR: vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	2.5	1.8	0.7
206472_s_at	TLE3: transducin-like enhancer of split 3	2.3	1.8	0.8
206127_at	ELK3: ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	2.3	1.6	0.7
219433_at	BCOR: BCL6 co-repressor	2.2	1.2	0.5
204197_s_at	RUNX3: runt-related transcription factor 3	2.2	1.0	0.5
208328_s_at	MEF2A: MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide A (myocyte enhancer factor 2A)	2.0	1.5	0.7
201473_at	JUNB: jun B proto-oncogene	2.0	1.5	0.7
209579_s_at	MBD4: methyl-CpG binding domain protein 4	1.7	2.2	1.3
1569108_a_at	ZNF589: zinc finger protein 589	1.4	2.1	1.5
209189_at	FOS: v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	1.3	2.7	2.2
204959_at	MNDA: myeloid cell nuclear differentiation antigen	1.2	2.5	2.1
Сигнальные пути TGF-β и BMP				
201185_at	PRSS11: protease, serine, 11 (IGF binding)	1.3	10.1	7.7
204790_at	SMAD7: SMAD, mothers against DPP homolog 7 (Drosophila)	6.2	5.1	0.8
204948_s_at	FST: follistatin	1.2	2.7	2.2
207069_s_at	SMAD6: SMAD, mothers against DPP homolog 6 (Drosophila)	2.2	1.8	0.8
205596_s_at	SMURF2: SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	2.6	1.5	0.6
Иммунный ответ				
220491_at	HAMP: hepcidin antimicrobial peptide	6.0	14.6	2.4
204174_at	ALOX5AP: arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	1.1	8.7	7.7
202988_s_at	RGS1: regulator of G-protein signalling 1	8.6	7.0	0.8
219434_at	TREM1: triggering receptor expressed on myeloid cells 1	1.5	4.1	2.7
219255_x_at	IL-17BR: interleukin 17 receptor B	1.1	3.8	3.6
206618_at	IL18R1: interleukin 18 receptor 1	1.0	2.8	2.6
1555116_s_at	SLC11A1: solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	1.3	2.7	2.0
208771_s_at	LTA4H: leukotriene A4 hydrolase	1.2	2.5	2.1
203788_s_at	SEMA3C: sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	1.3	2.3	1.7
208071_s_at	LAIR1: leukocyte-associated Ig-like receptor 1	1.8	2.2	1.2
209201_x_at	CXCR4: chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.4	1.8	0.7
Метаболизм липидов				
210004_at	OLR1: oxidised low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	6.0	20.0	3.3
204561_x_at	APOC2: apolipoprotein C-II	1.7	7.7	4.5
204416_x_at	APOC1: apolipoprotein C-I	1.4	3.1	2.2
203509_at	SORL1: sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	1.4	2.6	1.8
203381_s_at	APOE: apolipoprotein E	1.3	2.5	2.0
201186_at	LRPAP1: low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	1.2	2.4	2.0
1570432_at	ABCG1: ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	1.9	2.0	1.0
Клеточная адгезия				
1552806_a_at	SIGLEC10: sialic acid binding Ig-like lectin 10	1.7	4.8	2.9
1559921_at	PECAM1: platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	1.1	3.1	2.8
202351_at	ITGAV: integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	3.2	3.0	0.9
201042_at	TGM2: transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	1.1	2.7	2.4
201389_at	ITGA5: integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	2.5	2.0	0.8
205204_at	NMB: neuromedin B	1.1	2.0	1.8

Среди генов, экспрессия которых усиливалась под действием TGF- β 1 были выделены 5 функциональных групп (Таблица 1). Первая группа содержала 12 генов, участвующих в регуляции транскрипции, причем большинство из них (9 из 12) относились к генам «раннего ответа». Среди этих генов были обнаружены описанные Smad3-зависимые гены JUNB и FOS(Li et al, 2004) (Таблица 1). Вторая

группа содержала 5 генов, участвующих в регуляции сигнального пути, активируемого TGF- β или BMP, включая гены, отвечающие за негативную обратную связь - Smad7 и Smad6 (Piek et al, 1999). Три из 5 генов этой группы относились к «раннему ответу» (Таблица 1). Следующие 3 группы генов (регуляция иммунного ответа, транспорт и процессинг липидов, клеточная адгезия) в основном включали гены из группы «позднего ответа» (24 из 25). Гены, участвующие в регуляции иммунного ответа включали различные рецепторы, растворимые факторы, сигнальные молекулы, а так же ферменты, участвующие в синтезе лейкотриенов. Среди генов, участвующих в метаболизме липидов был рецептор для окисленных LDL, OLR1 (Draude and Lorenz, 2000), а так же и некоторые аполипопротеины (Таблица 1). Подобная классификация генов, позволяет утверждать, что при стимуляции зрелых макрофагов TGF- β 1 наряду с активацией генов, напрямую зависящих от Smad, происходит повышение экспрессии ряда транскрипционных факторов, которые в свою очередь приводят к активации генов «позднего ответа».

Подтверждение данных, полученных при помощи биочипов

Для подтверждения данных, полученных при помощи биочипов, экспрессия мРНК Smad7, ID3, OLR1 и IL-17BR была исследована при помощи количественной ПЦР. M2_{IL-4/ГК} стимулировали TGF- β 1 на 5-й день культуры, после чего клетки собирали через 1, 2, 3, 6, и 24 часа. Количественная ПЦР показала, что экспрессия мРНК OLR1 повышалась непрерывно на протяжении всего исследованного периода (Рис. 21). Повышение экспрессии мРНК OLR1 становилось статистически значимым через 3 часа стимуляции. В отличие от OLR1, увеличение экспрессии мРНК Smad7 и ID3 становилось статистически значимым уже через час после начала стимуляции клеток TGF- β 1 и сохранялась на этом уровне, на протяжении всего периода стимуляции (Рис. 21). В соответствии с ранее полученными данными (Рис. 19, Таблица 1), статистически достоверное увеличение экспрессии мРНК IL-17BR наблюдалось лишь через 24 часа стимуляции (Рис. 21). Важно отметить, что степень увеличения экспрессии генов, определенная при помощи количественной ПЦР, была значительно выше, чем степень увеличения экспрессии, выявленная при помощи биочипов. Так, например, экспрессия мРНК OLR1 увеличивалась в 19.7 раз по данным биочипов, но в 180 раз по данным количественной ПЦР. Эта разница в чувствительности двух методов позволила предположить, что возможно, усиление экспрессии генов в ответ на TGF- β 1 в M2_{IL-4} не было обнаружено по причине низкой чувствительности метода. Для проверки этого предположения экспрессия генов «раннего ответа» была исследована в M2_{IL-4} при помощи количественной ПЦР.

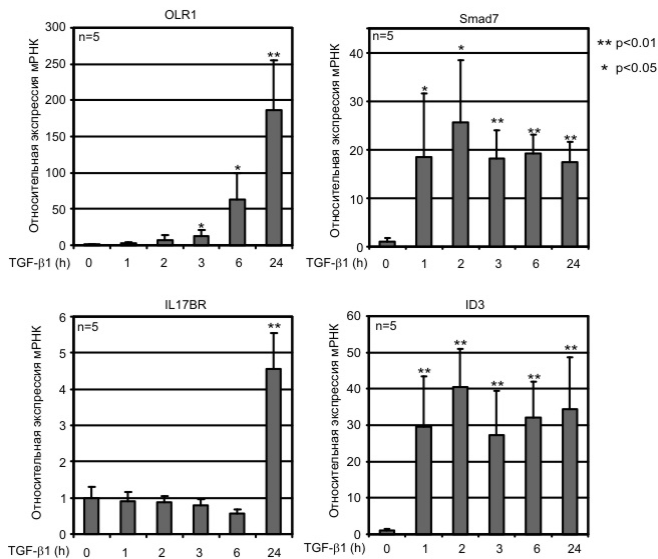


Рисунок 21. Анализ усиления экспрессии генов в M2_{IL-4}/ГК в ответ на стимуляцию TGF-β1. Макрофаги дифференцировались в присутствии IL-4 в комбинации с дексаметазоном в течение 5 дней. Стимуляция TGF-β1 проводилась, как указано. Уровень экспрессии мРНК определялся при помощи количественной ПЦР, экспрессия на момент начала стимуляции принималась за 1.

Анализ экспрессии генов «раннего ответа» в M2_{IL-4} стимулированных TGF-β1

M2_{IL-4} на 5-й день культуры стимулировали TGF-β1 в течение 3 и 24 часов, после чего экспрессию мРНК

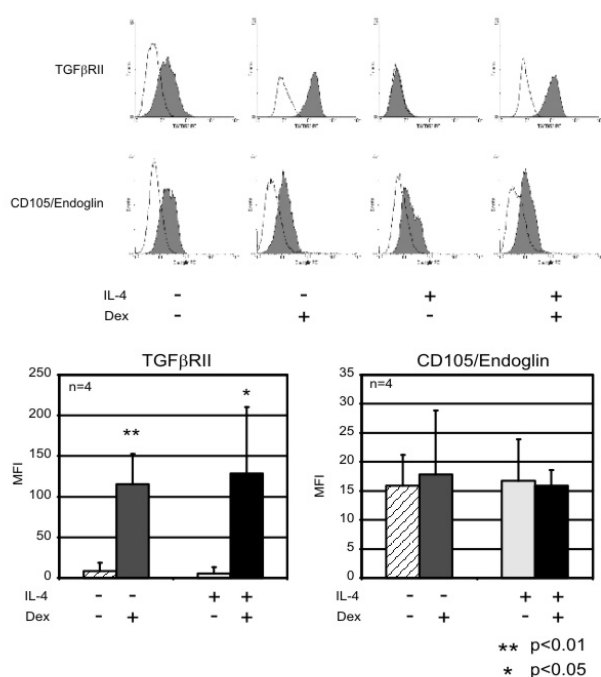
OLR1, Smad7 и ID3 измеряли при помощи количественной ПЦР. Действительно, статистически значимое увеличение экспрессии мРНК было обнаружено в случае ID3 и OLR1 после 24 часов стимуляции. Однако, степень увеличения экспрессии была существенно меньше, чем в случае M2_{IL-4}/ГК. Так, через 3 часа стимуляции TGF-β1, в M2_{IL-4} экспрессия мРНК Smad7 была увеличена в 2 раза, в то время как в M2_{IL-4}/ГК она была увеличена в 20 раз. Похожая разница была обнаружена в случае мРНК ID3 (4 раза в M2_{IL-4} и 30 раз в M2_{IL-4}/ГК) и OLR1 (1.6 раза в M2_{IL-4} и 12 раз в M2_{IL-4}/ГК). Через 24 часа стимуляции эта разница становилась еще более выраженной в случае мРНК OLR1 (2.5 раза в M2_{IL-4} и 180 раз в M2_{IL-4}/ГК). Вместе с данными, полученными при помощи биочипов, результаты количественной ПЦР указывают на то, что дексаметазон влияет на способность макрофагов отвечать на TGF-β. Предположительно, обработка макрофагов дексаметазоном приводит к появлению фундаментального молекулярного различия в TGF-β-зависимом сигнальном пути между M2_{IL-4} и M2_{IL-4}/ГК.

Дексаметазон регулирует поверхностную экспрессию TGFβRII

Так как регуляция экспрессии рецепторов для TGF-β на уровне мРНК была описана в макрофагах (Ashcroft, 1999; Pioli et al, 2004) и опухолевых клетках (Peltier et al, 2003), экспрессия мРНК TGFβRI (ALK5) и TGFβRII в разных популяциях макрофагов была исследована при помощи количественной ПЦР. Макрофаги культивировали в течение 5 дней в среде без стимуляторов, в присутствии дексаметазона, IL-4 и их комбинации. Полученные данные показали, что дексаметазон приводит к двухкратному повышению экспрессии мРНК рецепторов, которое не является статистически значимым. Исследование общего количества белка TGFβRII так же не выявило существенных различий

между макрофагами, стимулированными и не стимулированными дексаметазоном.

Так как активность рецептора может регулироваться на уровне поверхностной локализации, экспрессия TGFβRII и endoglin (вспомогательный рецептор для TGFβ) на поверхности макрофагов была исследована при помощи проточной цитометрии. Эксперимент показал, что TGFβRII экспрессируется на высоком уровне на поверхности макрофагов, стимулированных дексаметазоном (M2_{ГК}) или его комбинацией с IL-4 (M2_{IL-4/ГК}). При этом поверхностная экспрессия TGFβRII была значительно ниже в случае нестимулированных макрофагов, и полностью отсутствовала в случае M2_{IL-4} (Рис. 22). Количественный анализ полученных данных показал, что дексаметазон приводит к 13 кратному увеличению поверхностной экспрессии TGFβRII в M2_{ГК}



по сравнению с контрольными макрофагами и более чем 20 кратной разнице между M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4} (Рис. 22). В то же время endoglin экспрессировался в равной степени на поверхности всех исследованных популяций макрофагов, указывая на то, что наблюдаемый эффект не является общим для всех рецепторов к TGFβ, а специфичен для TGFβRII.

Рисунок 22. Анализ поверхностной локализации рецепторов TGFβRII и endoglin. Макрофаги культивировали в течение 5 дней в присутствии дексаметазона и IL-4 как указано. Поверхностную экспрессию рецепторов исследовали при помощи проточной цитометрии.

Дексаметазон приводит к поверхностной экспрессии рецептора к TGF-β

Для исследования влияния дексаметазона на экспрессию TGFβRII в присутствии цитокинов, отличных от IL-4, макрофаги культивировали в среде с добавлением IL-13, M-CSF и GM-CSF в комбинации с дексаметазоном или без него. Исследование поверхностной экспрессии TGFβRII через 5 дней культуры показало, что, так же как и IL-4, IL-13 приводил к снижению уровня экспрессии TGFβRII до фонового уровня. Стимуляция макрофагов M-CSF приводила к сохранению хорошо определяемой экспрессии TGFβRII на поверхности клеток, в то время как стимуляция GM-CSF приводила к сохранению лишь незначительной экспрессии TGFβRII. Добавление дексаметазона в

культуральную среду приводило к существенному повышению количества TGFβRII на поверхности клеток независимо от стимуляции.

Для исследования способности этих макрофагов отвечать на TGF-β1, была проанализирована экспрессия мРНК генов OLR1, IL17BR, ID3 и Smad7. Макрофаги культивировали 5 дней в среде, содержащей IL-13, M-CSF или GM-CSF с добавлением и без добавления дексаметазона и стимулировали TGF-β1 в течение 24 часов (Рис. 23). Количественная ПЦР показала, что экспрессия мРНК IL17BR и Smad7 не может быть активирована TGF-β1 в контрольных макрофагах и макрофагах, стимулированных каждым цитокином в отдельности без добавления дексаметазона. В то же время, экспрессия мРНК ID3 и OLR1 повышалась в ответ на стимуляцию TGF-β1 в контрольных макрофагах и макрофагах, стимулированных M-CSF (Рис. 23). Эти данные хорошо согласуются с обнаруженной остаточной экспрессией TGFβRII в контрольных макрофагах и макрофагах, стимулированных M-CSF.

Стимуляция макрофагов дексаметазоном, независимо от того в какой

комбинации он использовался, приводила к существенному увеличению экспрессии мРНК OLR1, ID3 и Smad7 в ответ на TGF-β1. Для IL17BR, существенное увеличение экспрессии наблюдалось только в случае стимуляции макрофагов комбинацией IL-13 и дексаметазона, так как необходимым условием для включения экспрессии гена IL17BR является наличие в среде IL-4 или IL-13 (Gratchev et al, 2004).

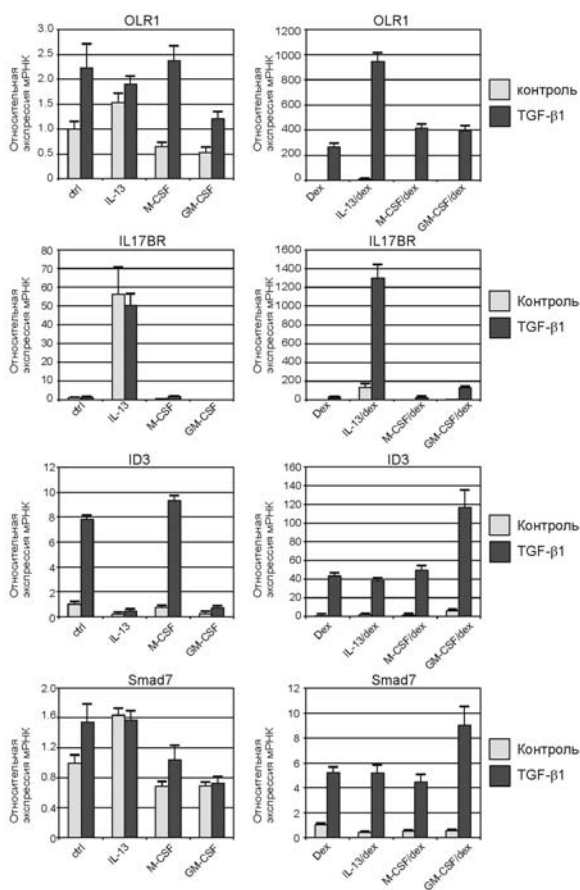
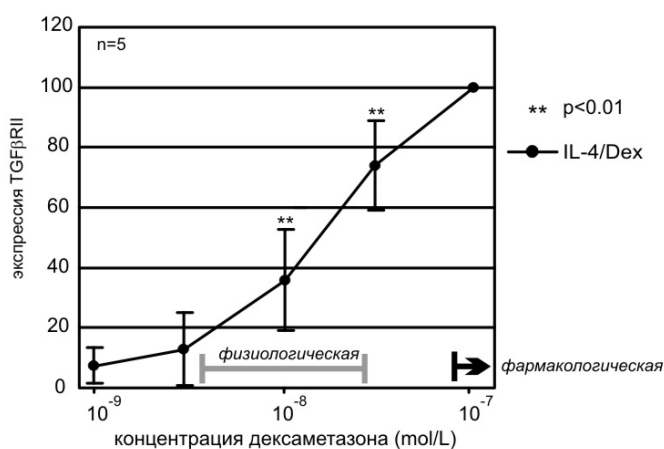


Рисунок 23. Исследование способности макрофагов отвечать на стимуляцию TGF-β1. Макрофаги культивировали в среде с добавлением цитокинов и дексаметазона, как указано, в течение 5 дней и стимулировали TGF-β1 в течение 24 часов. Экспрессию мРНК OLR1, IL17BR, ID3 и Smad7 исследовали при помощи количественной ПЦР.

Кинетика и дозозависимость действия дексаметазона на поверхностную экспрессию TGFβRII

Для исследования зависимости уровня поверхностной экспрессии TGFβRII от концентрации дексаметазона, использованного для стимуляции, макрофаги культивировали в течение 5 дней в присутствии IL-4 и различных концентраций дексаметазона в диапазоне от 1x10⁻⁷ до 1x10⁻⁹М. Уровень поверхностной экспрессии определялся при помощи проточной цитометрии. Эксперимент

показал четкую зависимость уровня экспрессии TGFβRII от концентрации дексаметазона. Различие между клетками, стимуляция которых включала дексаметазон, и контрольными клетками, стимулированными только IL-4, становилось статистически достоверным при концентрации дексаметазона 1×10^{-8} М. Эта концентрация попадает в диапазон, соответствующий диапазону физиологических концентраций кортизола в крови здорового взрослого человека (от 4×10^{-9} до 2×10^{-8} М) (Рис. 24). Стоит отметить, что концентрация 1×10^{-8} М приводит к уровню поверхностной экспрессии TGFβRII, который лишь в 3 раза ниже, чем уровень экспрессии, наблюдаемый на поверхности макрофагов, обработанных фармакологической концентрацией дексаметазона - 1×10^{-7} М (Рис. 24), которая обнаруживается в крови пациентов при системной терапии с



использованием глюкокортикоидов, например при лечении ревматоидного артрита (Wenting-Van Wijk et al, 1999).

Рисунок 24. Анализ зависимости уровня поверхностной экспрессии TGFβRII от концентрации дексаметазона. Макрофаги культивировали в течение 5 дней в присутствии IL-4 и различных концентраций дексаметазона. Уровень экспрессии TGFβRII измеряли при помощи проточной цитометрии. Уровень экспрессии в макрофагах стимулированных IL-4 и дексаметазоном в концентрации 1×10^{-7} М был взят за 100%.

Для понимания, является ли изменение уровня поверхностной экспрессии TGFβRII прямым эффектом дексаметазона, или же это результат сложных процессов, происходящих при дифференцировке макрофагов, была исследована кинетика увеличения поверхностной экспрессии TGFβRII. Макрофаги культивировали в присутствии IL-4 или комбинации IL-4 и дексаметазона в концентрации 1×10^{-7} М. Поверхностная экспрессия TGFβRII исследовалась на 1, 2, 3, 4 и 5 дни культуры при помощи проточной цитометрии. Эксперимент показал, что в M2_{IL-4} экспрессия TGFβRII падала до уровня фона в течение первых 3-х дней культуры (Рис. 25). Эти данные хорошо согласуются с опубликованными данными о потере поверхностной экспрессии TGFβRII макрофагами (Ashcroft, 1999). При этом в M2_{IL-4/ГК} поверхностная экспрессия TGFβRII незначительно снижалась после 1 дня культуры, и затем непрерывно повышалась, достигая плато на 4-й день культуры (Рис. 25). Разница в поверхностной экспрессии TGFβRII между M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} становилась статистически достоверной уже на 1-й день культуры (Рис. 25). Полученные данные указывают на то, что для поддержания поверхностной экспрессии TGFβRII, глюкокортикоид должен присутствовать в культуральной среде на протяжении всего периода дифференцировки

макрофагов. Таким образом, можно утверждать, что физиологические концентрации глюкокортикоидов достаточны для поддержания способности макрофагов отвечать на TGF- β . При этом особое внимание следует уделять повышению поверхностной экспрессии TGF β RII наблюдаемому при повышении концентрации глюкокортикоидов. Этот эффект необходимо учитывать при использовании глюкокортикоидов в терапевтических целях.

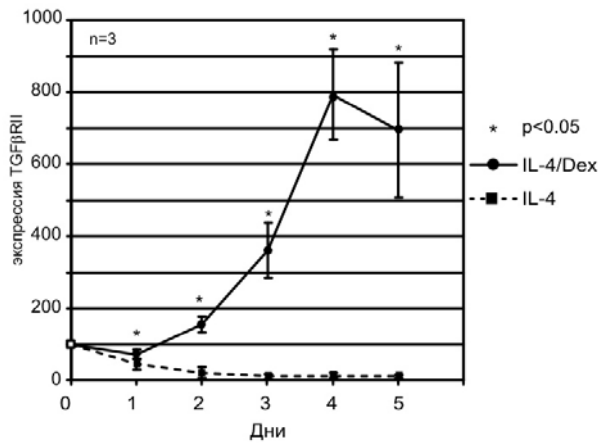
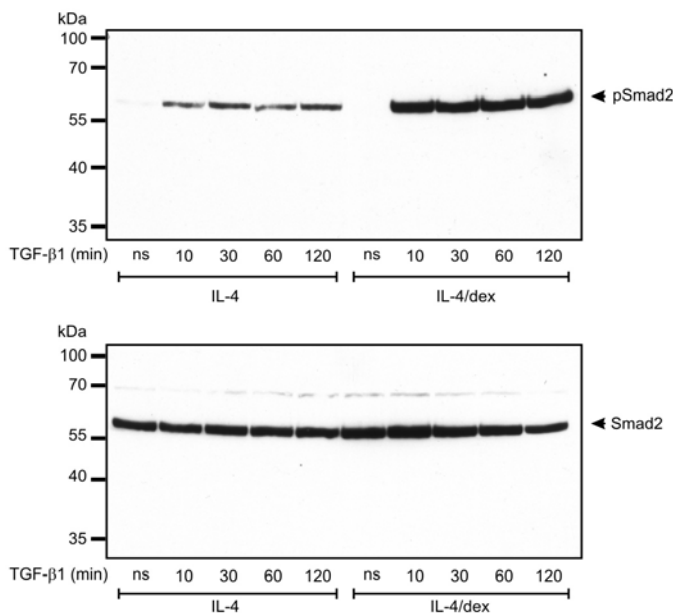


Рисунок 25. Анализ зависимости уровня поверхностной экспрессии TGF β RII от стадии дифференцировки макрофагов. Макрофаги культивировали в присутствии IL-4 или IL-4 в комбинации с дексаметазона в концентрации 1×10^{-7} M. Уровень экспрессии TGF β RII измеряли на 1, 2, 3, 4 и 5 дни при помощи проточной цитометрии. Уровень экспрессии в моноцитах был взят за 100%.

Функциональная активность TGF β RII

Повышенная поверхностная экспрессия TGF β RII должна приводить к эффективной активации Smad-зависимого сигнального пути при стимуляции клеток TGF- β . Для исследования активации Smad-зависимого сигнального пути было проанализировано фосфорилирование Smad2 в ответ на стимуляцию клеток TGF- β . M2_{IL-4} и M2_{IL-4/ГК} на 5-й день культуры стимулировали TGF- β 1 и при помощи Вестерн блоттинга определяли количество фосфорилированного Smad2 (Рис. 26). Было



обнаружено, что уже через 10 минут стимуляции количество фосфорилированного Smad2 было не менее чем в 10 раз больше в M2_{IL-4/ГК} по сравнению с M2_{IL-4}, причем это различие сохранялось на протяжении 2 часов стимуляции. Общее количество Smad2 в M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4} различалось незначительно (Рис. 26).

Рисунок 26. Анализ фосфорилирования Smad2 в M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4} при стимуляции TGF- β 1. Макрофаги культивировали в течение 5 дней и стимулировали TGF- β 1 как указано. Smad2 и фосфо-Smad2 (pSmad2) исследовали при помощи Вестерн блоттинга.

Хотя уровень фосфорилирования Smad2 в M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4} существенно различался, разницы в кинетике процесса обнаружено не было. В обеих популяциях макрофагов фосфорилированный Smad2 наблюдался уже через 10

минут стимуляции и его уровень оставался неизменным на протяжении 2-х часов. Однако, как было обнаружено при анализе дифференциальной экспрессии генов, TGF- β 1 активировал экспрессию Smad7 – негативного регулятора Smad-зависимого сигнального пути (Ten Dijke and Hill, 2004). Поэтому далее была исследована возможная разница в функционировании негативной регуляции Smad-зависимого сигнального пути между M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4}. Для этого эксперимента были выбраны временные точки 1 час, когда наблюдается значительно количество фосфорилированного Smad2, и 24 часа. Анализ количества фосфорилированного Smad2 показал, что через 24 часа стимуляции, его количество снижается до фонового уровня в M2_{IL-4}, в то время как в M2_{IL-4/ГК} Smad-зависимый сигнальный путь сохраняет достаточно высокую активность (Рис. 27).

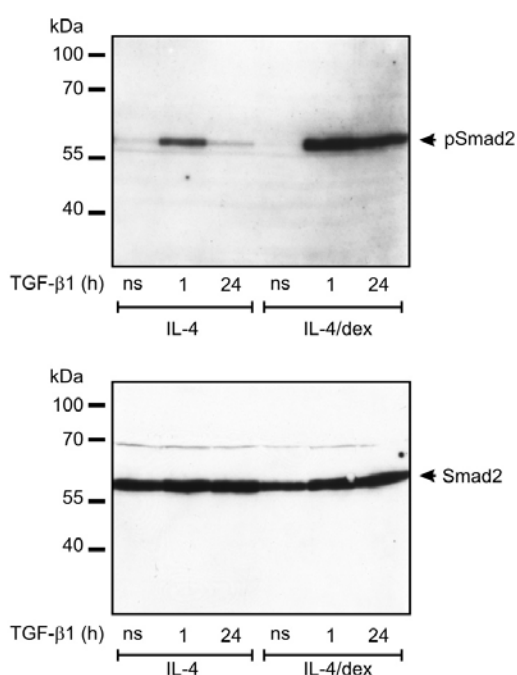


Рисунок 27. Анализ фосфорилирования Smad2 в M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4} при стимуляции TGF- β 1. Макрофаги культивировали в течение 5 дней и стимулировали TGF- β 1 как указано. Smad2 и фосфорилированный Smad2 (pSmad2) исследовали при помощи Вестерн блоттинга.

Эти данные позволяют заключить, что повышенная поверхностная экспрессия TGF β RII приводит к эффективной активации Smad-зависимого сигнального пути при стимуляции макрофагов TGF- β 1. Более того, сохраняющаяся в M2_{IL-4/ГК} в течение 24 часов активность Smad-зависимого сигнального пути указывает на то, что негативная регуляция этого процесса замедлена или даже полностью инактивирована при стимуляции макрофагов глюкокортикоидами.

Влияние дексаметазона на негативную обратную связь Smad-зависимого сигнального пути

Для выяснения механизма замедленной негативной обратной связи, наблюдаемой в M2_{IL-4/ГК}, была исследована экспрессия мРНК факторов, участвующих в этом процессе. M2_{IL-4/ГК} и M2_{IL-4} были стимулированы TGF- β 1 в течение 24 часов и экспрессия мРНК Smurf2, RNF111, FKBP1A, SKIL и SIRT1 была исследована при помощи количественной ПЦР. Все вышеперечисленные факторы, за исключением SIRT1 необходимы для эффективного функционирования негативной обратной связи. Механизм действия этого процесса включает интернализацию рецептора, его полиубиквитинирование и деградацию. Отсутствие разницы в экспрессии этих факторов между M2_{IL-4/ГК} и

M2_{IL-4} (Рис. 28) позволяет предположить, что при активации Smad7 количество TGFβRII на поверхности клетки должно снижаться. Действительно, в M2_{IL-4}/ГК количество рецептора снижалось примерно на 30% через 24 часа стимуляции TGF-β1 (Рис. 29). Несмотря на очевидное снижение поверхностной экспрессии рецептора, вопрос о причине недостаточной активности негативной обратной связи остается.

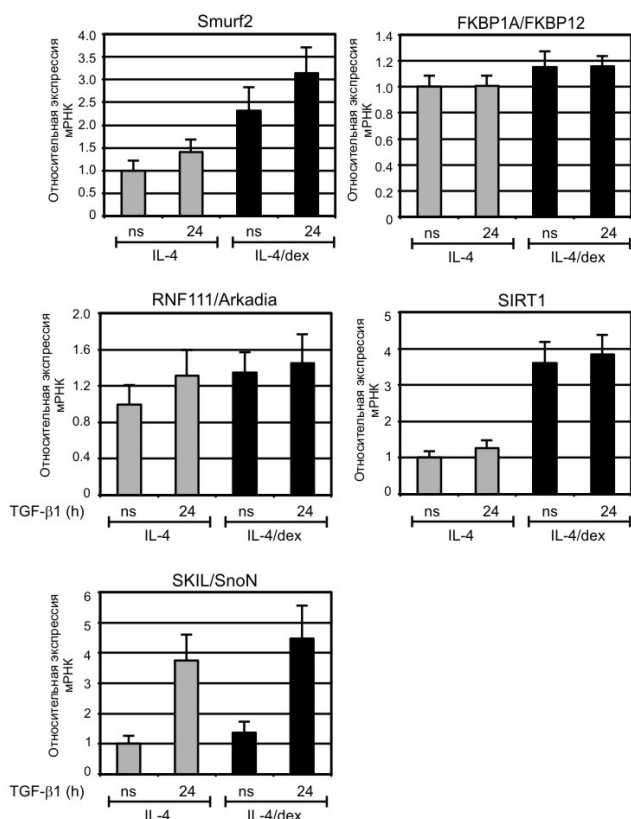


Рисунок 28. Анализ экспрессии факторов, участвующих в регуляции негативной обратной связи Smad-зависимого сигнального пути. Макрофаги культивировали в течение 5 дней в присутствии IL-4 или IL-4 в комбинации с дексаметазоном, и стимулировали TGF-β1 в течение 24 часов. Экспрессию мРНК Smurf2, RNF111, FKBP1A, SKIL и SIRT исследовали при помощи количественной ПЦР.

Ответ на это вопрос дает анализ экспрессии мРНК SIRT1, которая оказалась повышена в M2_{IL-4}/ГК. SIRT1 представляет собой фермент деацетилазу, который может приводить к деацетилированию Smad7 и его инактивации. Таким образом, повышенная поверхностная экспрессия TGFβRII в комбинации с пониженной активностью негативной обратной связи

приводит к продолжительной активности Smad-зависимого сигнального пути в M2_{IL-4}/ГК.

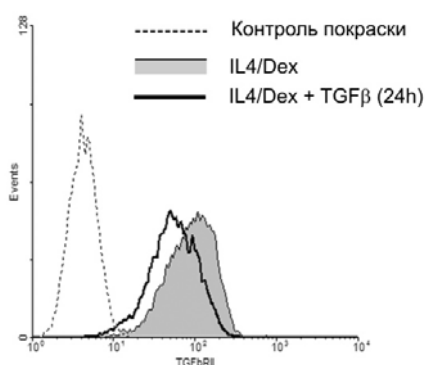


Рисунок 29. Анализ поверхностной экспрессии TGFβRII после 24 часов стимуляции TGF-β1. M_{IL-4}/ГК на 5-й день культуры стимулировали TGF-β1 в течение 24 часов. Экспрессию TGFβRII исследовали при помощи проточной цитометрии.

Проведенное исследование указывает на то, что зрелые макрофаги сохраняют способность отвечать на TGF-β и эта способность может усиливаться при использовании глюкокортикоидов в терапевтических концентрациях. Так как эффект глюкокортикоидов на макрофаги не зависит от других факторов, воздействующих на клетку, то и ответ макрофагов на TGF-β может изменяться в

зависимости от цитокинового окружения. Полученные данные можно использовать для создания адекватной модели для исследования свойств опухоли ассоциированных макрофагов *in vitro* и поиска подходов для воздействия на их фенотип и функциональную активность.

Исследование влияния TGF- β на макрофаги интересно прежде всего тем, что с начала 90-х годов прошлого века существовало мнение, что макрофаги неспособны отвечать на TGF- β . Было известно, что моноциты несут на своей поверхности до 400 активных рецепторов к TGF- β и способны ответить на стимуляцию снижением своего воспалительного потенциала, однако зрелые макрофаги теряют способность реагировать на TGF- β по причине потери экспрессии рецептора (Ashcroft, 1999; Brandes et al, 1991; McCartney-Francis and Wahl, 1994; Wong et al, 1991). Действительно, эксперименты, проводимые с нестимулированными макрофагами, и макрофагами, дифференцированными в присутствии IL-4, подтвердили ранее опубликованные данные. Однако, физиологические условия, в которых происходит дифференцировка макрофагов, не ограничиваются отдельными цитокинами (в данном случае IL-4). В циркуляции млекопитающих присутствует натуральный ГК – кортизол. Синтетический аналог кортизола – дексаметазон, использованный в представленных в данной работе экспериментах в концентрациях, соответствующих физиологическим, эффективно поддерживал поверхностную экспрессию рецептора к TGF- β в первичных человеческих макрофагах. Более того, повышение концентрации дексаметазона до фармакологических приводило к существенному повышению поверхностной экспрессии рецептора. Особенно стоит отметить, что дексаметазон повышал поверхностную экспрессию TGF β RII на уровне регуляции его клеточной локализации, так как общее количество белка TGF β RII в клетках было постоянным независимо от наличия глюкокортикоидов в среде. Подобный эффект глюкокортикоидов, то есть регуляция клеточной локализации белков без изменения уровня их экспрессии, наблюдался ранее в случае вирусных гликопротеинов (John et al, 1988), бета-катенина (Guan et al, 2004) и компонента плотного контакта ZO-1 (Buse et al, 1995). Несмотря на то, что данный феномен известен уже почти 20 лет, механизм этого явления остается неизученным.

Обнаружение условий необходимых для сохранения способности макрофагов отвечать на TGF- β , позволило исследовать эффект этого фактора роста на экспрессию генов в макрофагах. Было обнаружено повышение экспрессии целого ряда факторов, регулирующих транскрипцию, участвующих в регуляции иммунного ответа и клеточной адгезии. Кроме того, в отдельную группу могут быть выделены гены, отвечающие за метаболизм липидов.

Обнаруженные гены характерны для макрофагов, участвующих в хронических воспалительных процессах, таких как, например, атеросклероз. Соответствие полученного макрофагального фенотипа макрофагам, обнаруживаемым в атеросклеротической бляшке, прослеживается, прежде всего, по экспрессии генов, участвующих в метаболизме липопротеидов. Так было показано, что макрофаги атеросклеротической бляшки экспрессируют аполиipoprotein E (APOE)(Ramji et al, 2006), лектин-подобный рецептор для oxLDL-1 (LOX или OLR1)(Draude and Lorenz, 2000), аполиipoprotein C-II (APOC2)(Kawano et al, 2002), сортилин-подобный рецептор L (SORL1 или LR11), LRPAP1 и ABC транспортер ABCG1. Все эти гены участвуют в регуляции содержания холестерина в крови и так или иначе связаны с патогенезом атеросклероза (Carter, 2007; Ramji et al, 2006).

Однако, макрофаги атеросклеротической бляшки, имеющие фенотип характерный для хронического воспалительного процесса, по многим параметрам схожи с опухоль ассоциированными макрофагами. Наиболее ярким примером этого соответствия является повышенная экспрессия ферментов, участвующих в синтезе лейкотриена B₄. Так в образцах опухолей пищевода обнаруживалась повышенная экспрессия ALOX5AP и LTA4 гидролазы – ферментов, необходимых для синтеза лейкотриена B₄, роль которого в прогрессии и метастазировании опухолей была показана, например, для почечно-клеточной карциномы (Matsuyama et al, 2005).

Несмотря на то, что фенотип макрофагов, полученных в культуре при стимуляции IL-4, дексаметазоном и TGF- β отражает лишь некоторые свойства опухоль ассоциированных макрофагов, можно утверждать, что полученная модель отражает часть свойств необходимых этим клеткам для участия в патогенезе опухолей. Для приближения к физиологической ситуации необходимо включить в модель другие цитокины, производимые опухолью, сигналы, получаемые макрофагами в результате межклеточных контактов, а так же такие физические факторы, как гипоксия.

Выводы

Клонирование и функциональный анализ маркера макрофагов второго типа активации стабиллина-1 позволяет утверждать, что данный белок представляет собой многофункциональный сквенджер рецептор, участвующий в эндоцитозе различных продуктов распада. Повышенная экспрессия стабиллин-1 при стимуляции макрофагов дексаметазоном полностью согласуется с повышенным эндоцитозным потенциалом этого типа клеток.

На примере IL-4 и дексаметазона исследована гетерогенность популяции макрофагов второго типа активации. Показано, что для макрофагов, стимулированных IL-4 характерна продукция компонентов внеклеточного матрикса и ферментов для его перестройки, в то время как дексаметазон приводит к развитию макрофагов с высоким эндоцитозным и фагоцитозным потенциалом.

Исследование способности макрофагов первого и второго типов активации реагировать на различные экзо- и эндогенные стимулы позволило подтвердить гипотезу о пластичности макрофагального фенотипа.

Исследование макрофагов второго типа, стимулированных трансформирующим фактором роста бета, позволило выявить IL17RB как маркер этого типа макрофагов, что еще раз подтвердило концепцию гетерогенности макрофагальной популяции.

Проведен глобальный анализ дифференциальной экспрессии генов, в зрелых макрофагах, стимулированных трансформирующим фактором роста бета. На основании полученных данных можно сделать вывод, что TGF β стимулирует в макрофагах продукцию лейкотриенов, стимулирующих хемотаксис моноцитов и Т клеток. Кроме того, исследован механизм ответа макрофагов на TGF β и опровергнута гипотеза о неспособности макрофагов реагировать на этот цитокин по причине потери поверхностной экспрессии рецептора. Показано, что глюкокортикоиды отвечают за транспорт рецептора на поверхность клетки, обеспечивая эффективный ответ на TGF β .

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- (1) Gratchev A, Kzhyshkowska J, Kannookadan S, Ochsenreiter M, Popova A, Yu X, Mamidi S, Stonehouse-Usselman E, Muller-Molinet I, Gooi L, Goerd S. Activation of a TGF- β -Specific Multistep Gene Expression Program in Mature Macrophages Requires Glucocorticoid-Mediated Surface Expression of TGF- β Receptor II. *J Immunol.* 2008;180:6553-6565.
- (2) Kzhyshkowska J, Gratchev A, Schmuttermaier C, Brundiens H, Krusell L, Mamidi S, Zhang J, Workman G, Sage EH, Anderle C, Sedlmayr P, Goerd S. Alternatively Activated Macrophages Regulate Extracellular Levels of the Hormone Placental Lactogen via Receptor-Mediated Uptake and Transcytosis. *J Immunol.* 2008;180:3028-3037.

- (3) Kzhyshkowska J, Marciniak-Czochra A, Gratchev A. Perspectives of mathematical modelling for understanding of intracellular signalling and vesicular trafficking in macrophages. *Immunobiology*. 2007;212:813-825.
- (4) Gratchev A, Kzhyshkowska J, Kothe K, Muller-Molinet I, Kannookadan S, Utikal J, Goerdts S. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology*. 2006;211:473-486.
- (5) Kzhyshkowska J, Workman G, Cardo-Vila M, Arap W, Pasqualini R, Gratchev A, Krusell L, Goerdts S, Sage EH. Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol*. 2006;176:5825-5832.
- (6) Kzhyshkowska J, Gratchev A, Goerdts S. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions. *J Cell Mol Med*. 2006;10:635-649.
- (7) Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermair C, Krusell L, Haus G, Utikal J, Schledzewski K, Scholtze J, Goerdts S. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood*. 2006;107:3221-3228.
- (8) Martens JH, Kzhyshkowska J, Falkowski-Hansen M, Schledzewski K, Gratchev A, Mansmann U, Schmuttermair C, Dippel E, Koenen W, Riedel F, Sankala M, Tryggvason K, Kobzik L, Moldenhauer G, Arnold B, Goerdts S. Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis. *J Pathol*. 2006;208:574-589.
- (9) Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scand J Immunol*. 2005;61:10-17.
- (10) Kzhyshkowska J, Gratchev A, Brundiers H, Mamidi S, Krusell L, Goerdts S. Phosphatidylinositide 3-kinase activity is required for stabilin-1-mediated endosomal transport of acLDL. *Immunobiology*. 2005;210:161-173.
- (11) Cupurdija K, Azzola D, Hainz U, Gratchev A, Heitger A, Takikawa O, Goerdts S, Wintersteiger R, Dohr G, Sedlmayr P. Macrophages of Human First Trimester Decidua Express Markers Associated to Alternative Activation. *Am J Reprod Immunol*. 2004;51:117-122.
- (12) Kzhyshkowska J, Gratchev A, Martens JH, Pervushina O, Mamidi S, Johansson S, Schledzewski K, Hansen B, He X, Tang J, Nakayama K, Goerdts S. Stabilin-1 localizes to endosomes and the trans-Golgi network in human macrophages and interacts with GGA adaptors. *J Leukoc Biol*. 2004.

- (13) Politz O, Gratchev A, McCourt PA, Schledzewski K, Guillot P, Johansson S, Svineng G, Franke P, Kannicht C, Kzhyshkowska J, Longati P, Velten FW, Johansson S, Goerdt S. Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. *Biochem J.* 2002;362:155-164.
- (14) Birk RW, Gratchev A, Hakiy N, Politz O, Schledzewski K, Guillot P, Orfanos CE, Goerdt S. [Alternative activation of antigen-presenting cells: concepts and clinical relevance]. *Hautarzt.* 2001;52:193-200.
- (15) Gratchev A, Schledzewski K, Guillot P, Goerdt S. Alternatively activated antigen-presenting cells: molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14:272-279.
- (16) Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, Goerdt S. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol.* 2001;53:386-392.
- (17) Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology.* 1999;67:222-226.