

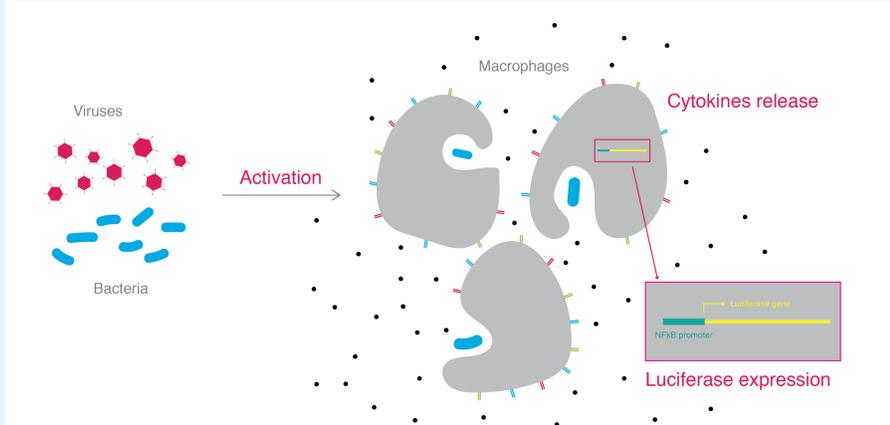
Поиск факторов, влияющих на пути активации врожденного иммунитета



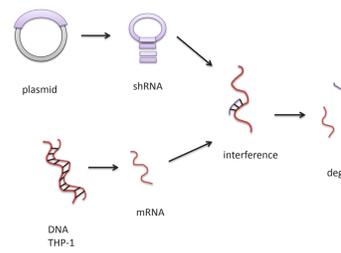
Виктория Бородина, Рита Гилева, Альба Гуэмбэ, Мария Долгая, Елизавета Игнатьева, Александра Колодяжная, Вера Соколова, Марлен Токтомаматов, Мария Шубина, Наталья Маркелова, Катя Путинцева, Елизавета Лещинер

Введение

Клетки врожденного иммунитета являются первой линией защиты организма, а также эффективным способом передачи информации о количественном и качественном составе патогенов. В нашей лаборатории работа посвящена изучению аутоиммунных заболеваний на примере болезни Крона, которая предположительно имеет бактериальную природу. В ходе работы мы использовали линию иммунных клеток человека – моноцитов (THP-1), и современные методы, такие как иммуно-ферментативный анализ ELISA, трансфекцию, люминесцентный репортер, с помощью которого мы измеряли уровень иммунной активации и выживаемость иммунных клеток. Первая задача нашей работы - определить, какие молекулярные элементы патогенов (PAMP, pathogen-associated molecular patterns) вызывают наибольший иммунный ответ и какие из иммунных рецепторов присутствуют на клетках THP-1. Вторая задача нашей работы – определить, какие гены и пути ответственны за иммунную активацию при помощи «выключения» (ингибирования) определенных генов-кандидатов методом РНК-интерференции.



Часть II



Из набора иммунных стимулов мы выбрали Pam3Cys чтобы определить гены, ответственные за путь иммунной активации. Наш список потенциальных генов включал в себя гены семейства TRIM (TRIM21, TRIM22, TRIM25, TRIM27, TRIM62, TRIM69, CARD9). Для каждого гена, мы использовали 3 короткошпилечных РНК чтобы увеличить вероятность его специфического выключения. Плазмиду с нуклеотидной последовательностью, транскрибируемую как кшРНК, мы размножили и очистили в E.Coli DH5a бактериях, чтобы позже использовать в клетках млекопитающих. Затем, мы трансфицировали данные плазмиды в клетки THP-1, в которых кшРНК должны были заблокировать матричную РНК выбранного нами гена. Если после отключения гена и иммуностимуляции

был уменьшен уровень активации люциферазы, это свидетельствовало о том, что данный ген был ответственным за пути иммунной активации. Для контроля выживаемости клеток, мы использовали краситель резазурин.

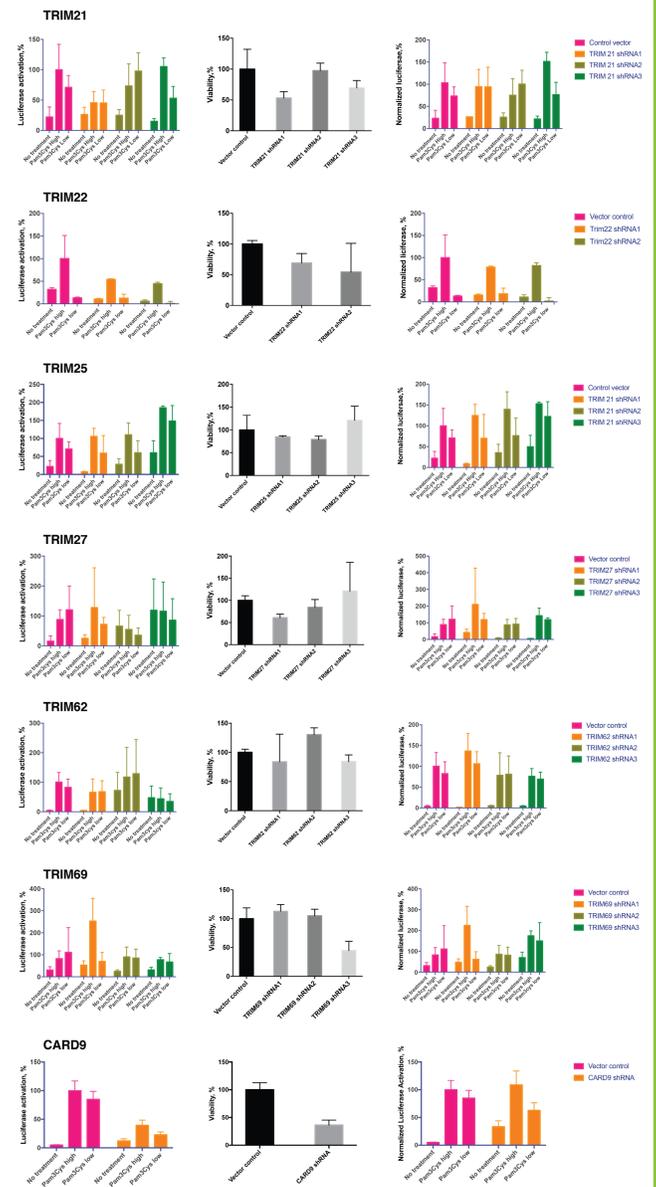


Рисунок 3

Часть I

Мы использовали линию клеток THP-1 со встроенным люциферазным репортером иммунной активации и различные иммунные стимулы: LPS, WGP, Zymosan, Pam3Cys, PolyI:C, R848, MDP. Эта же процедура была проведена для дифференцированных клеток иммунной системы (макрофагов) для измерения выделения цитокинов. Иммунные реагенты представляли собой бактериальные, грибковые и вирусные молекулярные структуры (PAMPs). Каждый из этих реагентов связывается с определенным рецептором иммунных клеток, который затем запускает каскад белковых взаимодействий и активацию транскрипции цитокинов. Для анализа и сравнения активации иммунной системы различными реагентами мы определяли активацию транскрипции при помощи измерения люминесценции люциферазного репортера ключевого транскрипционного фактора NF-kB.

Иммунные стимулы	Рецептор
LPS	TLR 2,4
WGP	Dectin 1
Zymosan	TLR 2, Dectin 1
Pam3Cys	TLR 1, 2
PolyI:C	TLR3
R848	TLR 7, 8
MDP	NOD 2

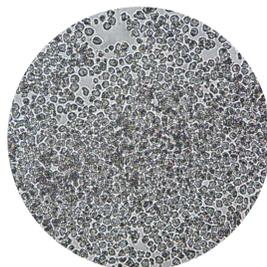
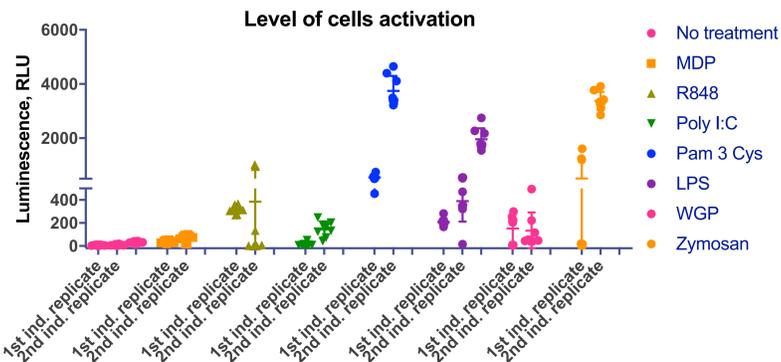


Рисунок 1



Конечный продукт иммунной активации – это проинфламаторные цитокины, выделяемые дифференцированными из THP-1 макрофагами. Мы использовали иммуноферментный анализ, или ИФА, для определения концентрации цитокина IL-6. IL-6 – один из основных про-воспалительных цитокинов, чья экспрессия и уровень значительно увеличены в аутоиммунных заболеваниях, в частности при болезни Крона.

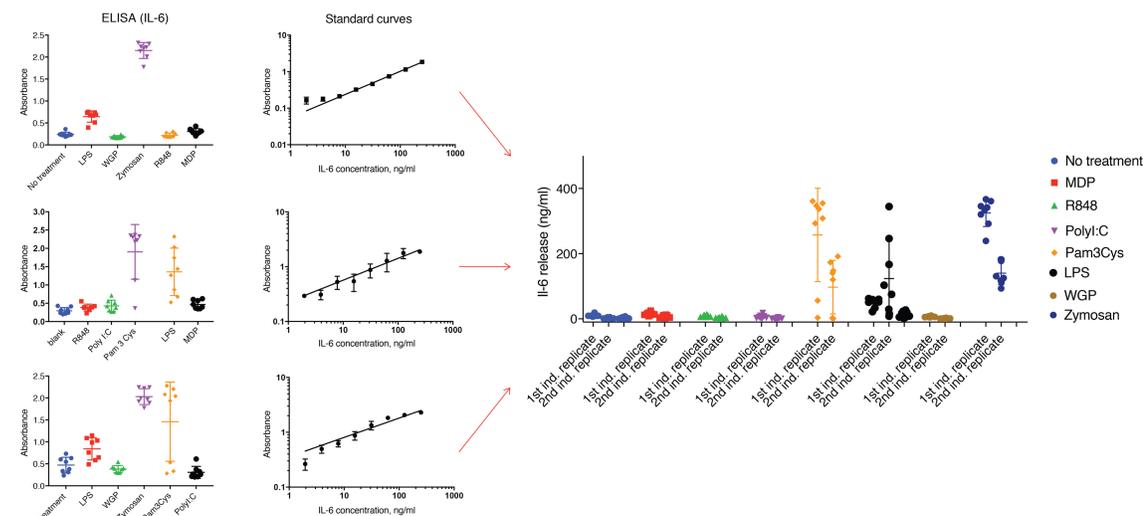


Рисунок 2

Выводы

- Мы обнаружили повышенную транскрипционную активность и выделение про-воспалительных цитокинов (IL-6) в моноцитах THP-1 в ответ на иммунную стимуляцию. Наиболее эффективным стимулом оказался бактериальный липопептид Pam3Cys.
- По результатам РНК-интерференции мы можем сделать предварительный вывод о влиянии некоторых генов (например, TRIM69 и TRIM22) на иммунную активацию. На основании полученных данных мы можем продолжить исследования.

Дополнительный материал:

