

УДК 577.21

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНА IL-12 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ИХ ОБРАБОТКИ ДИОКСИНОМ

© 2014 г. Д.Ю. Ощепков¹, Е.В. Кашина¹, Е.В. Антонцева¹,
Е.А. Ощепкова¹, В.А. Мордвинов¹, Д.П. Фурман^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: diman@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 17 декабря 2013 г. Принята к публикации 16 января 2013 г.

Интерлейкин-12 (IL-12) является важнейшим провоспалительным цитокином, синтезируемым макрофагами, однако данные о влиянии диоксина на его экспрессию до сих пор фрагментарны. Наличие выявленных нами ранее потенциальных DRE (dioxin responsive elements) в регуляторных районах генов *IL12A* и *IL12B*, кодирующих субъединицы цитокина IL-12p35 и IL-12p40 соответственно, предполагает возможность прямой активации этих генов через связывание DRE с комплексом диоксин/AhR/ARNT.

В настоящей работе связывающая способность этих DRE доказана с помощью гель-шифт анализа. Исследование динамики экспрессии генов *IL12A* и *IL12B* на модели макрофагоподобных клеток человека линии U937 не выявило влияния диоксина на уровень экспрессии гена *IL12A*. В то же время выявлена кратковременная активация, а затем падение экспрессии гена *IL12B*. Наблюдаемая динамика может объясняться прямой активацией экспрессии диоксин-содержащим комплексом и последующим подавлением экспрессии в результате оксидативного стресса, вызываемого диоксином. Таким образом, известный факт влияния диоксина на иммунную систему может быть связан в том числе и с различным его влиянием на динамику экспрессии генов, кодирующих субъединицы IL-12.

Ключевые слова: макрофаг, диоксин, интерлейкин-12.

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивное техногенное воздействие на биосферу приводит к увеличению содержания в окружающей среде ксенобиотиков различной природы, в частности диоксинов, к которым относятся сотни веществ. Среди них наибольшую опасность для человека представляет 2-,3-,7-,8-тетрахлородибензо-пара-диоксин (ТХДД) как наиболее токсичный из всех соединений диоксинового ряда (Walker *et al.*, 1999; Zodrow *et al.*, 2004).

Действие диоксина на организм человека носит системный характер и вызывает широкий спектр негативных дозозависимых эффектов

в отношении фактически всех жизненных функций. На иммунную систему он оказывает сильное супрессорное влияние, подавляя как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ (Mandal, 2005). При интоксикации диоксином создаются предпосылки для развития целого ряда иммунопатологий, включающих как иммунодефицитные, так и гиперактивированные состояния, на фоне которых развиваются аллергические, аутоиммунные и онкологические заболевания, меняются восприимчивость организма к инфекционным агентам и характер течения вызванных ими заболеваний (Steenland *et al.*, 2004; Knerr, Schrenk, 2006; Neff-LaFord *et al.*, 2007; Schulz *et al.*, 2013). Диоксин способен

нарушать иммунные реакции организма даже в минимальных дозах, что позволяет квалифицировать его как иммунотоксикант (Kerkvliet, 2012). Отметим, что механизмы реализации иммунотоксических эффектов диоксина до конца не выяснены. Токсическое действие диоксина, как и его метаболизм, опосредуется арилгидрокарбонным рецептором (AhR) – лиганд-активируемым транскрипционным фактором из семейства bHLH/PAS (Connor, Aylward, 2006), который участвует в регуляции экспрессии генов, содержащих опознаваемые этим фактором специфические сайты – так называемые dioxin responsive elements (DRE). В отсутствие лиганда AhR находится в цитоплазме клетки в комплексе с димером белка-шаперона Hsp90, кошапероном p23, иммуофилин-подобным белком AIP (Aryl hydrocarbon receptor-Interacting Protein), известным также как ARA9 или XAP2. После связывания с лигандом комплекс перемещается в ядро и диссоциирует (Fujii-Kuriyama, Kawajiri, 2010). Оставшийся связанным с лигандом AhR димеризуется с белком ARNT (AhR Nuclear Translocator) из того же семейства bHLH. Комплекс лиганд/AhR/ARNT функционирует как транскрипционный фактор. Связываясь с последовательностями DRE в регуляторных районах генов-мишеней, он инициирует транскрипцию целой батареи генов (Boutros *et al.*, 2004; Connor, Aylward, 2006; Marshall, Kerkvliet, 2010). Коровой консенсусной последовательностью DRE является 5'-TNGCGTG-3' (Boutros *et al.*, 2004). При взаимодействии комплекса лиганд/AhR/ARNT с DRE AhR контактирует с 5'-TNGC, а ARNT – с GTG-3' полусайтами консенсусной последовательности (Sun *et al.*, 2004).

Лигандами AhR служит большая группа химических веществ как эндогенного происхождения (билирубин, простагландины, метаболиты триптофана и др.), так и ксенобиотиков (полиароматические углеводороды, бифенилы и др.) (Denison, Nagy, 2003). Сильная токсичность ТХДД обусловлена его высокой аффинностью к AhR, с которым он, как лиганд, образует устойчивый комплекс.

С активацией AhR лигандами различной природы связано модулирование экспрессии многих генов в клетках различных типов, в том числе и клетках иммунной системы, участ-

вующих в реализации как врожденного, так и приобретенного иммунитета (Kerkvliet, 2012; Nguyen *et al.*, 2013; Schulz *et al.*, 2013).

Существенный компонент пула иммунокомпетентных клеток составляют макрофаги, обеспечивающие первое звено иммунной защиты организма. Они осуществляют фагоцитоз чужеродных макромолекул и бактерий, в кооперации с Т- и В-лимфоцитами реализуют и регулируют иммунный ответ, способны при определенных условиях оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки (Gordon, Taylor, 2005). С их участием происходит формирование неспецифического клеточного и гуморального иммунитета, а в качестве антигенпрезентирующих клеток они входят и в систему специфического иммунитета. Коммуникативными и эффекторными средствами макрофагов служат нарабатываемые ими медиаторы, в том числе интерлейкины. Одним из ключевых интерлейкинов является провоспалительный IL-12p70 – гетеродимерный белок, состоящий из двух субъединиц, IL-12p35 и IL-12p40, кодируемых генами *IL12A* и *IL12B* соответственно (Biswas *et al.*, 2012). Известно, что IL-12 усиливает пролиферацию и цитолитическую активность Т-клеток и натуральных киллеров, индуцирует продукцию интерферона гамма и обладает уникальной способностью к активации Т-хелперов, тем самым стимулируя клеточный иммунитет против патогенных микробов и опухолевых клеток. Кроме IL-12p70, субъединица IL-12p40 входит в состав IL-23, также секретируемого макрофагами и играющего значительную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний (Gee *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2010).

С учетом места IL-12 в функционировании иммунной системы человека в целом и макрофагов как одной из важнейших ее составляющих представляется актуальным исследование механизмов влияния диоксина на экспрессию его субъединиц, однако данные такого рода в литературе до сих пор отсутствуют. Ранее нами (Furman *et al.*, 2009) были предсказаны DRE в регуляторных районах генов обеих субъединиц IL-12, что могло обеспечить их реакцию на этот иммунотоксикант. В настоящей работе ставилась задача экспериментальной проверки функциональности выявленных DRE на модели культуры клеток U937 человека как одного из

наиболее адекватных объектов для исследования ответа макрофагов на диоксин *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались следующие реактивы: [α - 32 P]АТФ (6000 Ci/mmol) (Costa Mesa, CA); Taq ДНК полимераз (НПО «СибЭнзим», Россия); DNase I RNase-free (Fermentas, США); набор для проведения обратной транскрипции HighCapacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, США); реакционная смесь М-435 для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR GreenI (ЗАО «Синтол», Россия); этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) (Хеликон, Россия); бромистый этидий (Sigma-Aldrich, США); бромфеноловый синий (Sigma-Aldrich, США); агароза (Hybaid-AGS, Германия); ДНК-маркер 100 п.н. (10 фрагментов от 100 до 1000 п.н.) (СибЭнзим, Россия); 2,3,7,8-ТХДД (чистота > 99,99 %) (ЗАО «НПО Экрос», Россия); диметилсульфоксид (DMSO, Me₂SO) (чистота > 99,99 %); таблетированный препарат натрий-фосфатного буфера (Amresco, США); форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА, Sigma-Aldrich, США); коктейль ингибиторов протеаз (Pierce, США); фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) (Sigma-Aldrich, США); пенициллин-стрептомицин (Sigma-Aldrich, США); среда RPMI 1640 (ООО «Биолот», Россия); фетальная бычья сыворотка («Hyclone», США).

Поиск сайтов связывания арилгидрокарбонового рецептора

Поиск DRE в регуляторных районах генов проводился с помощью программного пакета SITECON (<http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/programs/sitecon/>, Oshchepkov *et al.*, 2004) в соответствии с процедурой, описанной ранее (Furman *et al.*, 2009). Для идентификации DRE параметры метода были выбраны таким образом, чтобы ошибка I рода (недопредсказание) равнялась нулю, что означает распознавание программой всех последовательностей из обучающей выборки. Анализировались участки генов *IL12A* и *IL12B* от -2000 до +600 относительно старта транскрипции. Последовательности были извлечены из БД UCSC Genome Browser database (Meyer *et al.*, 2013).

Клеточная культура

Исследования проводили с использованием перевиваемой клеточной линии промоноцитов человека U937, полученной из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор». С целью получения макрофагального фенотипа клетки в течение 48 ч инкубировали с ФМА в концентрации 0,2 мкг/мл, после чего отмывали стерильным натрий-фосфатным буфером и на 3 суток помещали в полную среду (RPMI 1640 (10 % FBS)), не содержащую ФМА. Полученные макрофагоподобные клетки обрабатывались 10 нМ 2,3,7,8-ТХДД (опыт) или 0,1 % (v/v) диметилсульфоксидом (контроль) в течение 15 мин; 1 ч; 2; 3; 4,5 и 6 ч. Далее клетки использовали для получения суммарной РНК и ядерного экстракта.

Количественная ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

Суммарная РНК выделялась с помощью набора Aurum Total RNA Mini Kit производства «Bio-Rad». Качество и количество выделенной РНК оценивалось на приборе Agilent 2100 Bioanalyzer (RIN $\geq$ 8 для всех проб) согласно инструкции производителя, а также электрофорезом РНК в 1 %-м агарозном геле. ДНК-азную обработку проводили набором DNase I, RNase-free фирмы «Fermentas» согласно инструкции производителя. Для синтеза кДНК использовали набор High Capacity cDNA Archive Kit производства «Applied Biosystems». Уровень экспрессии генов *IL12A*, *IL12B*, *CYP1A1*, *ATF3* определяли методом количественной ПЦР в реальном времени при использовании набора реактивов для ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I производства ЗАО «Синтол» на приборе ABI PRISM 7000. В качестве эндогенного контроля использовали ген домашнего хозяйства бета-актин (*ACTB*). Дизайн праймеров осуществлялся с помощью программы Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems) (табл. 1).

Метод задержки ДНК-зонда в геле белками ядерного экстракта

Получение белкового экстракта ядер из U937 макрофагов проводили следующим методом: 10^7 клеток инкубировали с 1 мл лизирующего

Таблица 1

Последовательности праймеров,
использованных для количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Структура прямого праймера	Структура обратного праймера
<i>IL12A</i>	tcccatgccttcaccactc	cttcagaagtgcagggtaaaattc
<i>IL12B</i>	ggaccttgaccagagcag	ctcgccctctttgtgacagg
<i>ATF3</i>	cctctgcgctggaatcagtc	ttctttctcgtcgctcttttt
<i>CYP1A1</i>	cccagctcagctcagtacct	gaggccagaagaaactccgt
<i>ACTB</i>	tggcattgccgacaggat	cggagtactgcgctcagga

буфера (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 1 mM ДТТ, 0,5 mM спермидин, 0,15 mM спермин, 0,1 mM ЭДТА, 0,1 mM ЭГТА, 0,5 mM ПМСФ, коктейль ингибиторов протеаз «Pierce») в течение 15 мин на льду, затем добавляли 62 мкл 10 %-го NP-40 и центрифугировали в течение 5 мин при 4 °C, 400 g. Осадок ядер лизировали в буфере (20 mM Hepes, 420 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM ЭДТА, 1 mM ДТТ, 25 %-й глицерин, коктейль ингибиторов протеаз «Pierce») в течение 20 мин на льду, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 4 °C, 10000 g. Супернатант, содержащий суммарный белок ядер, отбирали в чистую пробирку, измеряли концентрацию на спектрофотометре по методу Бредфорда, фасовали на аликвоты и хранили при –72 °C. В качестве ДНК-зондов использовали двуцепочечные олигонуклеотиды, соответствующие районам расположения предсказанных сайтов связывания AhR. Введение метки в ДНК-зонд осуществляли с помощью достройки укороченных 3'-концов фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I. Реакцию вели 5 мин при комнатной температуре в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 0,01 mM олигонуклеотида, 1 мкл 10× буфера для мечения (500 mM Трис-HCl pH = 8,0, 100 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 2 mM dГТФ, 2 mM dТТФ, 2 mM dСТФ), 2 единицы активности фрагмента Кленова, 10 мкКи (α -³²P) dATФ. Для очистки олигонуклеотидов от невключившейся метки реакционную смесь наносили на ионообменную бумагу ДЕАЕ-81 и промывали 0,25 M KН₂РO₄.

Анализ связывания фрагментов ДНК с белками ядерных экстрактов проводили по следующей методике: белковый ядерный экстракт инкубировали с обработанной ультразвуком

ДНК спермы лосося (из расчета 1 мкг ДНК на 7 мкг суммарного белка) в течение 10 мин на льду для предотвращения неспецифического связывания белков с ДНК-зондом. После этого 4 мкг экстракта добавляли к пробам, содержащим 50 pM радиоактивно меченого ДНК-зонда и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Электрофорез вели в 4,5 % ПААГ в 0,5×TBE при 40 °C. Гель выдерживали в фиксирующем растворе, высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Иммуноферментный анализ

Анализ содержания цитокина IL-12p70 методом ИФА проводился в кондиционной среде, полученной после 6 ч культивирования макрофагов U937 с концентрацией 10 нМ 2,3,7,8-ТХДД и 0,1 % (v/v) DMSO. Содержание оценивалось с помощью коммерческого набора IL-12p70 ELISA kit (#KAC1568, BioSource (USA)), согласно инструкции производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате биоинформатического анализа промоторных районов генов *IL12A* и *IL12B* было выявлено четыре потенциальных DRE, обнаруживших сходство с консенсусной последовательностью DRE (табл. 2).

Позиция выявленных сайтов вблизи старта транскрипции обоих генов является дополнительным аргументом в пользу их классификации как потенциальных DRE (Sun *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006), что делает их вероятными участниками регуляции этих генов при воздействии диоксида.

Таблица 2
Предсказанные DRE
в генах субъединиц цитокина IL-12

Ген	№	Позиция сайта относительно старта транскрипции	Последовательность сайта
IL12B	1	–598*	cacAcGCGTGcaca
	2	–660	aaaCtGCGTGtacc
	3	–1010	tgtCtGCGTGtacc
IL12A		–612*	accCtGCGTGccct
Консенсусная последовательность			TNGCGTG

* Выделены сайты, подвергнутые экспериментальной проверке.

Проверка связывающей способности потенциальных DRE с белковыми комплексами, содержащими AhR, была проведена методом задержки в геле. Были проверены два DRE из промоторных районов каждого из генов, кодирующих субъединицы гетеродимера IL-12, самых близких к старту транскрипции (выделены в табл. 2). В качестве контроля использовали DRE из энхансера гена *CYP1A1*. В результате связывающая способность этих двух сайтов подтвердилась (рис. 1).

На рис. 1 приведен радиоавтограф электрофоретического разделения ДНК-белковых комплексов, образованных после инкубации ³²P-меченых DRE-содержащих олигонуклеотидов с белками ядерного экстракта, выделен-

ного из клеток, обработанных ТХДД (10 нМ) в течение 24 часов.

На рис. 1 видно, что при добавлении белков экстрактов ядер к α -P32-меченым олигонуклеотидам образуется несколько ДНК-белковых комплексов. Комплекс «1» (верх) содержит AhR, так как он ослабляется при добавлении антител к AhR (дорожки, помеченные знаком «+») к белкам экстракта ядер. Видно также, что при этом образуется менее подвижный комплекс «S», включающий в себя помимо олигонуклеотида и белкового комплекса также и антитела к AhR (суперсдвиг).

На рис. 2 приведены оценки экспрессии генов, кодирующих белки двух субъединиц IL-12, и контрольного гена *CYP1A1* при действии диоксина. Ген *CYP1A1* выбран в качестве контроля, поскольку является одним из генов универсальной системы биотрансформации ксенобиотиков, экспрессирующихся во множестве тканей, в том числе и в макрофагах, в ответ на обработку диоксином (Sciullo *et al.*, 2009). Характер изменения экспрессии этого гена согласуется с литературными данными: уровень мРНК демонстрирует устойчивое нарастание в зависимости от времени воздействия диоксином.

В то же время динамика экспрессии генов *IL12A* и *IL12B* на тех же временных интервалах принципиально различна. Уровень мРНК *IL12A* сохраняется фактически неизменным вне зависимости от времени экспозиции диоксином, тогда как экспрессия *IL12B* возрастает более чем в 2 раза через 1 ч с момента воздействия,

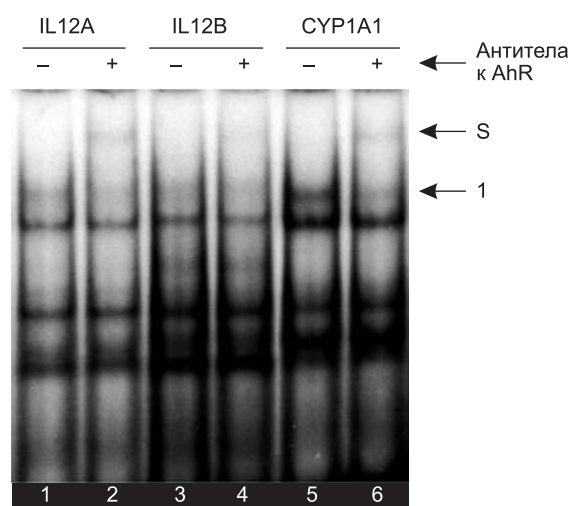


Рис. 1. Связывание белков экстрактов ядер с α -P32-мечеными олигонуклеотидами, соответствующими DRE из IL12A и сайту № 1 из IL12B, а также контрольному DRE из энхансера гена *CYP1A1*.

1 – полоса задержки, соответствующая AhR-содержащему белковому комплексу с олигонуклеотидом; S – суперсдвиг.

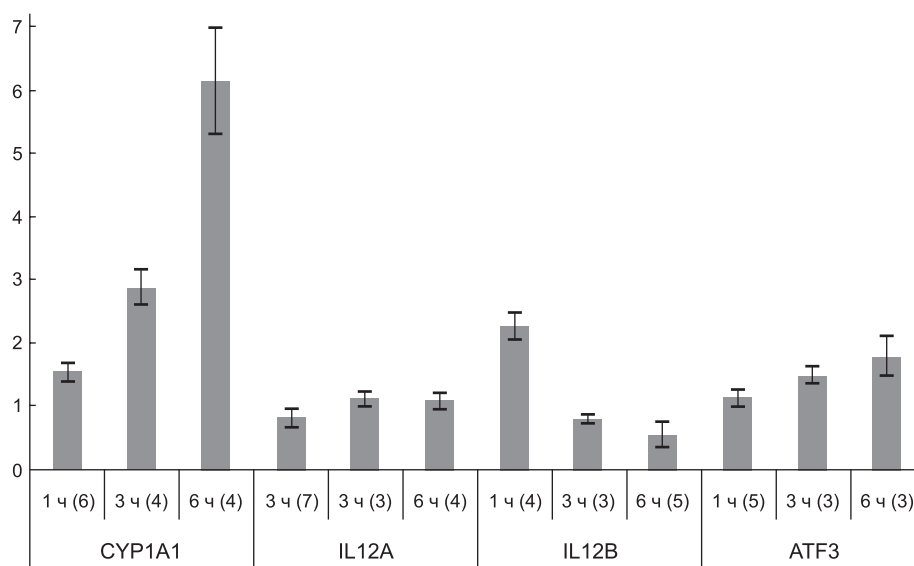


Рис. 2. Ранние эффекты воздействия 2,3,7,8-ТХДД на содержание мРНК генов *IL12A*, *IL12B*, *CYP1A1*, *ATF3* в макрофагоподобных клетках U937.

Клетки были обработаны 2,3,7,8-ТХДД в концентрации 10 нМ в течение 1, 3 и 6 ч. Экспрессия генов оценивалась методом ПЦР в реальном времени, данные нормализовались к уровню экспрессии гена домашнего хозяйства АСТВ. Уровень экспрессии мРНК дан относительно контрольного уровня – уровня мРНК в клетках, обработанных 0,1 % DMSO. По оси абсцисс приведена временная развертка, по оси ординат – значения относительной экспрессии мРНК со стандартной ошибкой, в скобках приведено количество экспериментов.

а к 6 ч показывает выраженное снижение до уровня, в 2 раза ниже контрольного.

ОБСУЖДЕНИЕ

В регуляторных районах генов *IL12A* и *IL12B* было выявлено 4 сайта, локализация которых позволяет рассматривать их как кандидаты на роль DRE. Нуклеотидные последовательности этих сайтов незначительно отличаются от канонической консенсусной последовательности TNGCGTG. Первый нуклеотид консенсусной последовательности во всех четырех выявленных потенциальных DRE отличался от консенсусного Т и соответствовал А в сайте № 1 в *IL12B* и С в сайте в *IL12A* и сайтах № 2, 3 в *IL12B*. Поскольку действие ксенобиотиков на активность индуцибельных генов опосредуется AhR и обусловлено его связыванием с DRE, мы проверили выявленные сайты на связывающую активность с AhR-содержащим комплексом. Два из них – ближайшие к старту транскрипции в каждом из генов (сайт **accCtGCGTGccct** в позиции –612 гена *IL-12A* и **cacAcGCGTGcaca** в позиции –598 гена *IL12B*) – продемонстриро-

вали способность связывать AhR-содержащий комплекс *in vitro*: в эксперименте по задержке в геле был получен положительный результат (рис. 1). Необходимо отметить, что отличия от консенсусной последовательности проверенного нами сайта гена *IL12A* и сайтов № 2 и 3 в гене *IL12B* совпадают, что дает основание приписать этим непроверенным нами сайтам AhR-связывающую способность.

Дополнительным аргументом в пользу функциональности упомянутых DRE как сайтов связывания AhR является их положение относительно области сверхчувствительности к ДНКазе (DNase hypersensitive area, DHA). Как правило, регуляторные районы и промоторы чувствительны к ДНКазе, так что расположение сайта в таком районе косвенно свидетельствует в пользу его функциональности. Основываясь на данных проекта ENCODE (Raney *et al.*, 2011), мы проверили локализацию выявленных DRE относительно DHA. Поскольку данные по макрофагальной линии в библиотеке ENCODE отсутствуют, мы ориентировались на данные для типов клеток, также способных синтезировать IL-12: В-клеток, моноцитов и В-лимфоцитов

(Watford *et al.*, 2003). Оказалось, что все выявленные сайты из регуляторных зон обоих генов попадают в ДНА. При этом два максимально близких к старту транскрипции DRE, № 1 и № 2 из *IL12B* (–598 и –660), обнаруживаются в ДНА, выявленных для 4-клеточных линий из библиотеки ENCODE, в том числе и для В-клеточной линии CD20⁺; сайт из *IL12A* – в ДНА, выявленном для двух В-лимфоцитарных клеточных линий GM19238 и GM19240. DRE № 3, удаленный на 1010 п.о. от старта транскрипции *IL12B*, располагается в зоне ДНА 104 клеточных линий, в том числе моноцитарной клеточной линии Monocytes-CD14⁺_RO01746, В-клеточной линии CD20⁺ и В-лимфоцитарных клеточных линиях GM19238 и GM19240. Таким образом, этот участок можно, видимо, рассматривать как универсальный регуляторный элемент гена *IL12B*.

Наблюдаемое достоверное (более чем двукратное) увеличение уровня мРНК *IL12B* через 1 час после воздействия диоксина соответствует времени максимальной транслокации транскрипционного комплекса AhR в ядро (Kotuga *et al.*, 2001) и свидетельствует о прямой активации гена *IL12B* через его связывание с выявленным DRE.

Происходящее далее падение экспрессии *IL12B* после трех- и шестичасовой экспозиции диоксина может быть следствием оксидативного стресса, который является одним из проявлений токсического действия диоксина на различные типы клеток, в том числе и на макрофаги (Alsharif *et al.*, 1994; Stohs, 1990). Показано, что оксидативный стресс стимулирует экспрессию транскрипционного фактора ATF3 (Jin *et al.*, 2008), который выступает негативным регулятором экспрессии *IL12B* в макрофагах (Gilchrist *et al.*, 2006; Zheng, Abraham, 2013).

Исходя из этих данных, мы провели исследование экспрессии *ATF3* после воздействия диоксина. Как видно из рис. 2, уровень экспрессии *ATF3* после 1 часа обработки не меняется, однако увеличивается более чем в 1,5 раза и более чем в 2 раза после трехчасовой и шестичасовой экспозиции соответственно. Наблюдаемая динамика отрицательно коррелирует с экспрессией *IL12B*.

Несмотря на наличие DRE в гене *IL12A*, его экспрессия при воздействии диоксина не

меняется. Учитывая постоянный уровень экспрессии *IL12A* и характер динамики изменений экспрессии *IL12B*, следовало ожидать снижения содержания IL12p70 в зависимости от времени экспозиции диоксина. Действительно, проведенная методом ELISA оценка показала, что после 4,5 и 6 ч воздействия диоксина содержание белка IL-12 находится на границе чувствительности метода (данные не приведены). Этот результат согласуется с литературными данными о снижении содержания белка IL12p70 после воздействия ТХДД на лабораторных животных (Fujimaki *et al.*, 2002; Ciftci *et al.*, 2010; Simones, Shepherd, 2011).

Совокупность полученных результатов позволяет предложить двойной механизм регуляции экспрессии гена *IL12B* при воздействии диоксина. Сначала происходит прямая активация его транскрипции диоксин-содержащим комплексом арил-гидрокарбонового рецептора через DRE в его промоторе и/или энхансере. Затем вследствие оксидативного стресса, вызванного воздействием ТХДД, увеличивается экспрессия ATF3, что ведет к существенному снижению экспрессии *IL12B* и, как следствие, IL-12 в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования на модели макрофагоподобных клеток U937 выявлена различная реакция генов *IL12A* и *IL12B* на диоксин. Факт различной индуцибельности генов, кодирующих субъединицы IL-12 под воздействием других факторов, был известен и ранее (Babik *et al.*, 1999; Gee *et al.*, 2009; Hamza *et al.*, 2010; Jalah *et al.*, 2013), однако различная индуцибельность этих генов в ответ на диоксин показана впервые. Этот эффект, в свою очередь, может сказываться на содержании цитокинов, в состав которых входят соответствующие субъединицы, в частности цитокина IL-23, в состав которого входит субъединица IL-12p40. Таким образом, воздействие диоксина на экспрессию субъединиц IL-12p35 и IL-12p40 может изменять баланс цитокинов, статус иммунной системы и характеристики иммунного ответа, что, в свою очередь, может частично объяснять широкий спектр эффектов диоксина на иммунную систему. Для более детального

изучения механизма регуляции экспрессии *IL12B* и выяснения дозо-зависимого эффекта при воздействии диоксина необходимы дополнительные исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФИ 12-04-01736-а. Авторы выражают благодарность М.Ю. Шаманиной за ценные замечания при обсуждении работы.

ЛИТЕРАТУРА

- Alsharif N.Z., Lawson T., Stohs S.J. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex // *Toxicology*. 1994. V. 92. No. 1/3. P. 39–51.
- Babik J.M., Adams E., Tone Y., Fairchild P.J., Tone M., Waldmann H. Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit // *J. Immunol*. 1999. V. 162. No. 7. P. 4069–4078.
- Biswas S.K., Chittezhath M., Shalova I.N., Lim J.Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease // *Immunol. Res.* 2012. V. 53. No. 1/3. P. 11–24.
- Boutros P.C., Moffat I.D., Franc M.A., Tuomisto J., Okey A.B. Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting // *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. No. 3. P. 707–715.
- Ciftci O., Tanyildizi S., Godekmerdan A. Protective effect of curcumin on immune system and body weight gain on rats intoxicated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2010. V. 32. No. 1. P. 99–104.
- Connor K.T., Aylward L.L. Human response to dioxin: aryl hydrocarbon receptor (AhR) molecular structure, function, and dose-response data for enzyme induction indicate an impaired human AhR // *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2006. V. 9. No. 2. P. 147–171.
- Denison M.S., Nagy S.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003. V. 43. P. 309–334.
- Fujii-Kuriyama Y., Kawajiri K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2010. V. 86. No. 1. P. 40–53.
- Fujimaki H., Nohara K., Kobayashi T., Suzuki K., Eguchi-Kasai K., Tsukumo S., Kijima M., Tohyama C. Effect of a single oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on immune function in male NC/Nga mice // *Toxicol. Sci.* 2002. V. 66. No. 1. P. 117–24.
- Fujita H., Samejima H., Kitagawa N., Mitsuhashi T., Washio T., Yonemoto J., Tomita M., Takahashi T., Kosaki K. Genome-wide screening of dioxin-responsive genes in fetal brain: bioinformatic and experimental approaches // *Cong. Anom.* 2006. V. 46. P. 135–143.
- Furman D.P., Oshchepkova E.A., Oshchepkov D.Yu., Shamanina M.Yu., Mordvinov V.A. Promoters of the genes encoding the transcription factors regulating the cytokine gene expression in macrophages contain putative binding sites for aryl hydrocarbon receptor // *Comput. Biol. Chem.* 2009. V. 33. No. 6. P. 465–468.
- Gee K., Guzzo C., Che Mat N.F., Ma W., Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders // *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 2009. V. 8. No. 1. P. 40–52.
- Gilchrist M., Thorsson V., Li B., Rust A.G., Korb M., Roach J.C., Kennedy K., Hai T., Bolouri H., Aderem A. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4 // *Nature*. 2006. V. 441. No. 7090. P. 173–178.
- Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. No. 12. P. 953–964.
- Hamza T., Barnett J.B., Li B. Interleukin 12 a key immunoregulatory cytokine in infection applications // *Int. J. Mol. Sci.* 2010. V. 26. No. 11(3). P. 789–806.
- Jalah R., Rosati M., Ganneru B., Pilkington G.R., Valentin A., Kulkarni V., Bergamaschi C., Chowdhury B., Zhang G.M., Beach R.K., Alicea C., Broderick K.E., Sardesai N.Y., Pavlakis G.N., Felber B.K. The p40 subunit of interleukin (IL)-12 promotes stabilization and export of the p35 subunit: implications for improved IL-12 cytokine production // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. No. 9. P. 6763–6776.
- Jin M.H., Hong C.H., Lee H.Y., Kang H.J., Han S.W. Enhanced TGF-beta1 is involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induced oxidative stress in C57BL/6 mouse testis // *Toxicol. Lett.* 2008. V. 178. No. 3. P. 202–209.
- Kerkvliet N.I. TCDD: an environmental immunotoxicant reveals a novel pathway of immunoregulation – a 30-year odyssey // *Toxicol. Pathol.* 2012. V. 40. No. 2. P. 138–142.
- Knerr S., Schrenk D. Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models // *Mol. Nutr. Food Res.* 2006. V. 50. No. 10. P. 897–907.
- Komura K., Hayashi S., Makino I., Poellinger L., Tanaka H. Aryl hydrocarbon receptor/dioxin receptor in human monocytes and macrophages // *Mol. Cell Biochem.* 2001. V. 226. No. 1/2. P. 107–118.
- Mandal Prabir K. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology // *J. Comp. Physiol. (B)*. 2005. V. 175. P. 221–230.
- Marshall N.B., Kerkvliet N.I. Dioxin and immune regulation: emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010. V. 1183. P. 25–37.
- Meyer L.R., Zweig A.S., Hinrichs A.S., Karolchik D., Kuhn R.M., Wong M., Sloan C.A., Rosenbloom K.R., Roe G., Rhead B., Raney B.J., Pohl A., Malladi V.S., Li C.H., Lee B.T., Learned K., Kirkup V., Hsu F., Heitner S., Harte R.A., Haeussler M., Guruvadoo L., Goldman M., Giardine B.M., Fujita P.A., Dreszer T.R., Diekhans M., Cline M.S., Clawson H., Barber G.P., Haussler D., Kent W.J. The UCSC Genome Browser database: extensions and updates 2013 // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 64–69.
- Neff-LaFord H., Teske S., Bushnell T.P., Lawrence B.P. Aryl hydrocarbon receptor activation during influenza virus infection unveils a novel pathway of IFN-gamma production by phagocytic cells // *J. Immunol.* 2007. V. 179. No. 1. P. 247–255.

- Nguyen N.T., Hanieh H., Nakahama T., Kishimoto T. The roles of aryl hydrocarbon receptor in immune responses // *Int. Immunol.* 2013. V. 25. No. 6. P. 335–343.
- Oshchepkov D.Y., Vityaev E.E., Grigorovich D.A., Ignatieva E.V., Khlebodarova T.M. SITECON: a tool for detecting conservative conformational and physicochemical properties in transcription factor binding site alignments and for site recognition // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 208–212.
- Raney B.J., Cline M.S., Rosenbloom K.R., Dreszer T.R., Larned K., Barber G.P., Meyer L.R., Sloan C.A., Malladi V.S., Roskin K.M., Suh B.B., Hinrichs A.S., Clawson H., Zweig A.S., Kirkup V., Fujita P.A., Rhead B., Smith K.E., Pohl A., Kuhn R.M., Karolchik D., Haussler D., Kent W.J. ENCODE whole-genome data in the UCSC genome browser (2011 update) // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 871–875.
- Schulz V.J., Smit J.J., Pieters R.H. The aryl hydrocarbon receptor and food allergy // *Vet. Q.* 2013. V. 33. No. 2. P. 94–107.
- Sciullo E.M., Dong B., Vogel C.F., Matsumura F. Characterization of the pattern of the nongenomic signaling pathway through which TCDD-induces early inflammatory responses in U937 human macrophages // *Chemosphere.* 2009. V. 74. No. 11. P. 1531–1537.
- Simones T., Shepherd D.M. Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells // *Toxicol. Sci.* 2011. V. 119. No. 2. P. 293–307.
- Steenland K., Bertazzi P., Baccarelli A., Kogevinas M. Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen // *Environ. Health Perspect.* 2004. V. 112. No. 13. P. 1265–1268.
- Stohs S.J. Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) // *Free Radic. Biol. Med.* 1990. V. 9. No. 1. P. 79–90.
- Sun Y.V., Boverhof D.R., Burgoon L.D., Fielden M.R., Zacharewski T.R. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 4512–4523.
- Walker N.J., Portier C.J., Lax S.F., Crofts F.G., Li Y., Lucier G.W., Sutter T.R. Characterization of the dose-response of *CYP1B1*, *CYP1A1*, and *CYP1A2* in the liver of female Sprague-Dawley rats following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999. V. 154. P. 279–286.
- Watford W.T., Moriguchi M., Morinobu A., O'Shea J.J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003. V. 14. No. 5. P. 361–368.
- Zheng S., Abraham C. NF- κ B1 inhibits NOD2-induced cytokine secretion through ATF3-dependent mechanisms // *Mol. Cell. Biol.* 2013. V. 33. No. 24. P. 4857–4871.
- Zodrow J.M., Stegeman J.J., Tanguay R.L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish // *Aquat. Toxicol.* 2004. V. 66. P. 25–38.

DYNAMICS OF IL12 CYTOKINE EXPRESSION IN HUMAN MACROPHAGES AFTER TREATMENT WITH DIOXIN

**D.Y. Oshchepkov¹, E.V. Kashina¹, E.V. Antontseva¹,
E.A. Oshchepkova¹, V.A. Mordvinov¹, D.P. Furman^{1,2}**

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: diman@bionet.nsc.ru;

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Interleukin IL-12 is a key proinflammatory cytokine, synthesized by macrophages, but the information concerning the dioxin effect on its expression is still fragmentary. The presence of previously identified potential dioxin responsive elements (DREs) in the regulatory regions of *IL12A* and *IL12B* genes, encoding IL-12 subunits IL-12p35 and IL-12p40, respectively, suggests direct activation of these genes by binding of the dioxin/AhR/ARNT complex to DREs. This work proves the binding capacity of these DREs by gel shift assay. The study of the dynamics of *IL12A* and *IL12B* gene expression in the human macrophage cell line U937 revealed no influence of dioxin on *IL12A* expression. In contrast, activation of *IL12B* gene expression with subsequent inhibition was noted. The observed dynamics can be explained by direct activation of the expression by the dioxin-containing complex and subsequent inhibition of the expression because of oxidative stress caused by dioxin. Thus, the well-known dioxin influence on the immune system can be associated with the difference in the dioxin effect on the expression dynamics of the genes encoding IL-12 subunits.

Key words: macrophage, dioxin, IL-12.