

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ РАХ-5 И STAT6 В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Еремеева А.В.

*Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Цель — выявить возможное взаимодействие РАХ-5 и STAT6 при бронхиальной астме (БА). Обследовано 35 здоровых лиц, 83 больных аллергической БА (АБА) и 63 — неаллергической БА (НАБА). Экспрессию мРНК РАХ-5 и β -актина оценивали с помощью обратной транскрипции — ПЦР. Измерение количества белков STAT6 и фосфо-STAT6 проводили с помощью Вестерн-блоттинга по методике Amersham. Выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнями экспрессии мРНК РАХ-5 и STAT6 как в группе контроля, так и при АБА. Уровни экспрессии мРНК РАХ-5 и STAT6 отрицательно коррелируют у больных АБА с нормальным уровнем IgE. Уровни экспрессии активной формы — pSTAT6 значимо и отрицательно коррелируют с экспрессией мРНК РАХ-5 у больных с высоким содержанием IgE, с эозинофилией крови и мокроты. При АБА наблюдалось значимое снижение экспрессии мРНК РАХ-5 при воздействии IL-4 по сравнению со здоровыми лицами. Наиболее сильная и значимая отрицательная связь экспрессии мРНК РАХ-5 и фактора STAT6 определяется у лиц с высоким содержанием РАХ-5 и низким содержанием STAT6. Отрицательная значимая корреляция между экспрессией STAT6 и мРНК РАХ-5 позволяет предположить, что при АБА STAT6 угнетает транскрипцию РАХ-5, что способствует дифференцировке В-клеток в плазматические клетки.

Ключевые слова: бронхиальная астма, РАХ-5, STAT6, pSTAT6, лимфоциты

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич
д.м.н., профессор кафедры госпитальной
терапии СПбГМУ имени академика
И.П. Павлова
198516, Россия, Санкт-Петербург,
Петродворец, Санкт-Петербургский пр.,
56, кв. 15.
Тел.: 8 (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Авторы:

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор кафедры госпитальной
терапии имени академика М.В. Черноруцкого
Санкт-Петербургского государственного медицинского
университета имени академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия
Сорокина Л.Н. — д.м.н., доцент кафедры госпитальной
терапии имени академика М.В. Черноруцкого
Санкт-Петербургского государственного медицинского
университета имени академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия
Нёма М.А. — аспирант кафедры госпитальной терапии
имени академика М.В. Черноруцкого
Санкт-Петербургского государственного медицинского
университета имени академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия
Еремеева А.В. — аспирант кафедры госпитальной
терапии имени академика М.В. Черноруцкого
Санкт-Петербургского государственного медицинского
университета имени академика И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия

Поступила 12.04.2013

Принята к печати 15.04.2013

INTERACTION OF TRANSCRIPTION FACTORS PAX-5 AND STAT6 IN PATHOGENESIS OF ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA

Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Ereemeeva A.V.

St. Petersburg State I.P. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was to study an opportunity of coordinated expression of PAX-5 and STAT6 in bronchial asthma (BA) development. 35 healthy controls, 83 patients with allergic bronchial asthma (ABA) and 63 patients with nonallergic bronchial asthma (NABA) of different severity were observed. To evaluate PAX-5 and β -actin mRNA levels, a reverse transcription-PCR with endpoint detection was applied. To determine STAT6 and pSTAT6 protein levels, ECL Western blotting protocols (Amersham) was used. A negative correlation was revealed between PAX-5 and STAT6 mRNA expression levels in control group and in ABA. In NABA patients, the appropriate correlations were nonsignificant. Expression of PAX-5 mRNA in ABA with normal IgE levels showed a significant negative correlation with that of STAT6. Meanwhile, expression levels of active pSTAT6 form in patients with high IgE and eosinophilia did negatively correlate with PAX-5 mRNA expression. In ABA, effects of IL-4 caused a more significant decrease of PAX-5 mRNA as compared with those in control group. The strongest negative correlation between PAX-5 mRNA expression and STAT6 levels was revealed in groups with higher levels of mRNA PAX-5 and lower levels of STAT6. The revealed negative correlations between STAT6 levels and PAX-5 mRNA expression suggest that STAT6 may inhibit PAX-5 transcription in ABA group, thus, probably, promoting differentiation of B cells into plasma cells. (*Med. Immunol.*, 2014, vol. 16, N 1, pp 35-42)

Keywords: bronchial asthma, PAX-5, STAT6, pSTAT6, lymphocytes

Address for correspondence:

Mineev Valeriy N.
PhD, MD, Professor, M.V. Chernorutsky Department
of Hospital Therapy, St. Petersburg State I.P. Pavlov
Medical University
198156, Russian Federation, St. Petersburg,
Petrodvorets, Sankt-Peterburgskiy pr., 56-15.
Phone: 7 (812) 450-71-63.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Authors:

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor,
M.V. Chernorutsky Department of Hospital Therapy,
St. Petersburg State I.P. Pavlov Medical University,
St. Petersburg, Russian Federation
Sorokina L.N., PhD, MD (Medicine), Associate
Professor, M.V. Chernorutsky Department of Hospital
Therapy, St. Petersburg State I.P. Pavlov Medical
University, St. Petersburg, Russian Federation
Nyoma M.A., PhD Candidate, M.V. Chernorutsky
Department of Hospital Therapy, St. Petersburg State
I.P. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian
Federation
Ereemeeva A.V., PhD Candidate, M.V. Chernorutsky
Department of Hospital Therapy, St. Petersburg State
I.P. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian
Federation

Received 12.04.2013

Accepted 15.04.2013

Введение

Внутриклеточные системы лимфоцитов являются, как известно, ключевыми факторами развития различных патологических процессов: опухолей, аллергического воспаления, иммунодефицитов. Ранее мы уже рассматривали роль сигнальной системы JAK-STAT (Janus-kinase — signal transducer and activator of transcription) в развитии и течении бронхиальной астмы (БА) [1, 2, 3]. Мы также анализировали роль в патогенезе БА транскрипционного фактора PAX-5, который, как и фактор STAT6 в В-лимфоцитах, участвует в процессах синтеза иммуноглобулина Е и рецептора к нему FcεR II (CD23) [9, 13]. Участие этих двух белков в процессах, значимых в патогенезе бронхиальной астмы, позволяет предположить взаимовлияние этих транскрипционных факторов, поэтому **целью нашей работы** было выявление возможного взаимодействия PAX-5 и STAT6 в механизмах развития БА.

Материалы и методы

Обследовано 35 практически здоровых лиц, 83 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 63 — неаллергической БА (НАБА) различной тяжести течения.

Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. Проводили комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический анализы мокроты, а также аллергологическое исследование. В обследованных группах проводили исследование функции внешнего дыхания. Диагноз устанавливали и проводили лечение в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2010). Для исследования использовали лимфоциты из периферической крови здоровых лиц и больных БА, выделенные на градиенте плотности Lymphoseparation Medium («ICN») с использованием стандартной методики выделения мононуклеаров с последующим удалением моноцитов с осаждением на пластике в условиях инкубации в среде IMDM при 37 °С в течение 40 мин, 24-часовую инкубацию лимфоцитов проводили при 37 °С также в среде IMDM в присутствии IL-4 в концентрации 10 нг/мл; в пробы, инкубированные без IL-4, добавляли IMDM.

Вестерн-блоттинг

После инкубации лимфоциты помещали на лед и все дальнейшие процедуры проводили при 4 °С. Клетки промывали один раз холодным

фосфатно-солевым буферным раствором. Тотальный лизат получали добавлением к пробам 0,1 мл лизирующего буфера, содержащего ингибиторы протеаз. После инкубации в течение 10 мин при 4 °С, клеточный лизат центрифугировали при 10000 об/мин. К надосадку добавляли часть буферного раствора для электрофоретических проб и инкубировали в течение 5 мин при +100 °С. Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле при 30 мА в течение 2 часов. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Иммуноблоттинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocols (Amersham). Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку. Для специфического выявления STAT6 использовали поликлональные STAT6 антитела (Cell Signaling Technology, США). В качестве вторичных антител применяли козы антигенов, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAM-HRP, Sigma, CIF).

RT-PCR

Экспрессию мРНК PAX-5 оценивали путем проведения RT-PCR (reverse transcription-PCR — обратная транскрипция — полимеразная цепная реакция [ПЦР]) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из лимфоцитов периферической крови. ПЦР проводили в амплификаторе «iCycler» (BIO-RAD) в следующем режиме: инициация при 95 °С в течение 4-х мин, 30 циклов денатурации при 95 °С в течение 30 с, отжига при 60 °С в течение 30 с и полимеризации при 70 °С в течение 30 с. Завершающую полимеризацию проводили при 72 °С в течение 7 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом. Результат электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировали в программе Gel-Pro 3.1. Уровень экспрессии мРНК PAX-5 оценивали относительно уровня β-актина.

Праймеры для PAX-5 и β-актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank). PAX-5 5': 5'- gga act tgg aga ggg agc tt-3' и PAX-5 3': 5'- ggc tct acc tgg ctg ttc tg-3'; β-актин 5': 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3' и β-актин 3': 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3'.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы SPSS 13.0 с использованием методов и критериев непараметрической статистики при малом значении числа наблюдений: критериев Вилкоксона, Манна—Уитни, коэффициента корреляции Спирмена. Для оценки нормальности распределения применяли критерий Колмогорова—Смирнова.

Результаты

Для выявления возможного взаимодействия и его характера транскрипционных факторов PAX-5 и STAT6 в патогенезе аллергической бронхиальной астмы исследование строилось на основе пошагового анализа.

Первым шагом при исследовании было установление корреляционных связей уровней экспрессии исследуемых молекул у практически здоровых лиц и при обоих вариантах заболевания (табл. 1).

Из таблицы 1 видно, что корреляционная связь между исследуемыми молекулами носит отрицательный характер как в группе контроля, так и в при обоих вариантах БА. При этом наиболее сильной и статистически существенной обнаружена связь в группе контроля только между мРНК PAX-5 и pSTAT6, а в группе больных АБА — между мРНК PAX-5, STAT6 и pSTAT6. В группе больных НАБА выявленные отрицательные корреляционные связи не имели статистической значимости.

Вторым шагом исследования был анализ корреляций уровней экспрессии исследуемых моле-

кул в группах больных АБА различной тяжести течения (табл. 2).

Из таблицы 2 видно, что статистически существенные корреляционные связи мРНК PAX-5 выявлены у больных АБА со средней тяжестью течения как с STAT6, так и с его фосфорилированной формой pSTAT6. У больных АБА с легким течением заболевания установлена статистически значимая связь мРНК PAX-5 только со STAT6.

При НАБА с различной тяжестью течения корреляционные связи между исследуемыми молекулами носили отрицательный характер, но были статистически незначимы.

Отметим, что при тяжелом течении обоих вариантов заболевания уровень корреляционных связей, хотя и сохраняет отрицательный характер, но не достигает статистически существенного уровня.

Третьим шагом анализа взаимодействия транскрипционных факторов PAX-5 и STAT6 в патогенезе аллергической БА с учетом их значимости в переключении В-лимфоцитов на синтез IgE была оценка корреляций уровней экспрессии этих факторов в группах больных АБА с нормаль-

ТАБЛИЦА 1. КОРРЕЛЯЦИИ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ мРНК PAX-5 С УРОВНЯМИ STAT6 И pSTAT6 (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ) У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И У БОЛЬНЫХ БА (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ ПИРСОНА r)

Обследованные группы	STAT6	pSTAT6
Практически здоровые лица	$r = -0,339$; $p = 0,169$; $n = 18$	$r = -0,460$; $p = 0,047$; $n = 19$
АБА	$r = -0,398$; $p = 0,006$; $n = 47$	$r = -0,320$; $p = 0,025$; $n = 48$
НАБА	$r = -0,259$; $p = 0,097$; $n = 42$	$r = -0,183$; $p = 0,245$; $n = 42$

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИИ УРОВНЕЙ ЭКСПРЕССИИ мРНК PAX-5 С УРОВНЯМИ STAT6 И pSTAT6 (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β -АКТИНУ) У ЛИЦ, СТРАДАЮЩИХ БА РАЗНОЙ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ ПИРСОНА r И КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА ρ)

БА		STAT6	pSTAT6
легкого течения	АБА	$r = -0,442$; $p = 0,045$; $n = 21$	$r = -0,238$; $p = 0,298$; $n = 21$
	НАБА	$\rho = -0,500$; $p = 0,667$; $n = 3$	$\rho = 0,500$; $p = 0,667$; $n = 3$
средней степени тяжести	АБА	$r = -0,598$; $p = 0,011$; $n = 17$	$r = -0,540$; $p = 0,017$; $n = 19$
	НАБА	$\rho = -0,095$; $p = 0,770$; $n = 12$	$\rho = -0,624$; $p = 0,023$; $n = 13$
тяжелого течения	АБА	$r = -0,257$; $p = 0,505$; $n = 9$	$r = -0,430$; $p = 0,248$; $n = 9$
	НАБА	$\rho = -0,429$; $p = 0,289$; $n = 8$	$\rho = -0,144$; $p = 0,758$; $n = 7$

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ мРНК PAX-5 С УРОВНЯМИ STAT6 И pSTAT6 У ЛИЦ С АБА С УРОВНЯМИ ОБЩЕГО IgE, ЭОЗИНОФИЛИИ КРОВИ (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ ПИРСОНА r) И ЭОЗИНОФИЛИИ МОКРОТЫ (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА ρ)

Показатели	STAT6	pSTAT6
IgE \leq 150 МЕ/мл	$r = -0,468$; $p = 0,033$; $n = 21$	$r = -0,257$; $p = 0,248$; $n = 22$
IgE $>$ 150 МЕ/мл	$r = -0,299$; $p = 0,139$; $n = 26$	$r = -0,394$; $p = 0,042$; $n = 27$
Содержание эозинофилов крови $>$ 2%	$r = -0,433$; $p = 0,003$; $n = 46$	$r = -0,307$; $p = 0,034$; $n = 48$
Содержание эозинофилов крови \leq 2%	$r = -0,205$; $p = 0,150$; $n = 51$	$r = -0,235$; $p = 0,097$; $n = 51$
Цитограмма мокроты (содержание эозинофилов 12-20%)	$\rho = -0,305$; $p = 0,138$; $n = 25$	$\rho = -0,572$; $p = 0,003$; $n = 25$
Цитограмма мокроты (содержание эозинофилов $>$ 20%)	$\rho = -0,418$; $p = 0,121$; $n = 15$	$\rho = -0,254$; $p = 0,326$; $n = 17$

ным и повышенным содержанием сывороточного IgE (табл. 3).

Кроме этого, была проведена оценка корреляций уровней экспрессии этих факторов в группах больных АБА с различными уровнями таких характерных для аллергического варианта БА признаков, как эозинофилия крови и мокроты (табл. 3).

Как следует из таблицы 3, экспрессия STAT6 значимо коррелирует с мРНК PAX-5 у больных с нормальным уровнем IgE. С другой стороны, уровни экспрессии активной формы pSTAT6 коррелируют с экспрессией мРНК PAX-5 в группе высокого содержания сывороточного IgE. При этом обе корреляционные связи имеют отрицательный знак.

Также выявлена отрицательная корреляционная связь экспрессии мРНК PAX-5 с экспрессией белков STAT6 и pSTAT6, причем эта связь наблюдается только при более высокой эозинофилии крови.

Что касается аналогичной связи при исследовании эозинофилии мокроты, то высокостатистическая отрицательная корреляционная связь выявлена только между мРНК PAX-5 и pSTAT6 при содержании эозинофилов в цитограмме мокроты 12-20%. При более выраженной эозинофилии мокроты ($>$ 20%) подобная связь статистически не достоверна.

Основным цитокином в патогенезе БА считается IL-4, действие которого опосредовано транскрипционным фактором STAT6. Мы оценили экспрессию мРНК PAX-5 в лимфоцитах, инкубированных в среде с содержанием IL-4 в концентрации 10 нг/мл и без присутствия IL-4.

В группе больных АБА наблюдалось значимое снижение экспрессии мРНК PAX-5 при воздействии IL-4 ($p = 0,039$; $n = 17$, $t = 2,244$), в группе

здоровых лиц это снижение не было значимым ($p = 0,950$; $n = 8$, $t = 0,065$) (критерий Стьюдента). При использовании критерия Вилкоксона–Манна–Уитни результат был аналогичен: $Z = -2,201$; $p = 0,028$ для группы больных АБА и $Z = -0,140$; $p = 0,889$ (рис. 1).

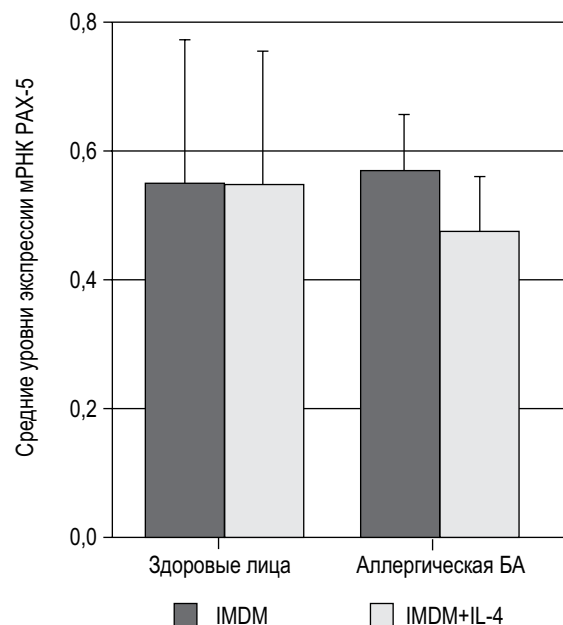


Рисунок 1. Средние уровни экспрессии мРНК PAX-5 в лимфоцитах больных аллергической БА и практически здоровых лиц в условиях 24-часовой инкубации в среде IMDM без IL-4 (IMDM) и с добавлением IL-4 (IMDM + IL-4) ($M \pm \sigma$)

Примечание. При аллергической БА под действием IL-4 наблюдается значимое снижение экспрессии мРНК PAX-5 в лимфоцитах периферической крови по сравнению с изначальным уровнем. У практически здоровых лиц эта экспрессия значимо не меняется.

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ мРНК PAX-5 С УРОВНЯМИ STAT6 И pSTAT6 У ЛИЦ С ИХ РАЗНЫМИ УРОВНЯМИ (КОЭФФИЦИЕНТЫ КОРРЕЛЯЦИИ СПИРМЕНА r)

Экспрессия транскрипционных факторов	STAT6	pSTAT6
STAT6 меньше 0,6 (по отношению к β -актину)	$r = -0,363$; $p = 0,007$ $n = 56$	$r = -0,313$; $p = 0,02$ $n = 55$
STAT6 больше 0,6 (по отношению к β -актину)	$r = -0,156$; $p = 0,268$ $n = 52$	$r = -0,146$; $p = 0,306$ $n = 51$
pSTAT6 меньше 0,15 (по отношению к β -актину)	$r = -0,317$; $p = 0,021$ $n = 53$	$r = -0,161$; $p = 0,255$ $n = 52$
pSTAT6 больше 0,15 (по отношению к β -актину)	$r = -0,190$; $p = 0,165$ $n = 50$	$r = -0,211$; $p = 0,125$ $n = 54$
мРНК PAX-5 меньше 0,55 (по отношению к β -актину)	$r = -0,215$; $p = 0,151$ $n = 46$	$r = -0,233$; $p = 0,111$ $n = 48$
мРНК PAX-5 больше 0,55 (по отношению к β -актину)	$r = -0,279$; $p = 0,029$ $n = 61$	$r = -0,134$; $p = 0,300$ $n = 62$

С учетом предполагаемого взаимодействия STAT6 и PAX-5 мы проанализировали уровни корреляции экспрессий этих факторов в группах с высокими и низкими их концентрациями (табл. 4).

Анализ представленных в таблице 4 корреляций позволяет заключить, что наиболее сильная и достоверная отрицательная связь экспрессии мРНК PAX-5 и фактора STAT6 определяется в группах лиц с высоким содержанием мРНК PAX-5 и низким содержанием STAT6.

Этот факт позволяет предположить наличие сложного механизма регуляции транскрипции PAX-5.

При высоком содержании STAT6 транскрипция PAX-5, вероятно, мало подвержена отрицательному воздействию этого фактора и его активной формы, и уровни экспрессии мРНК PAX-5 нарастают. Когда продукция PAX-5 становится более интенсивной, его транскрипция становится более чувствительной к отрицательному воздействию STAT6. В то же время при низких концентрациях STAT6 транскрипция PAX-5 предположительно находится под более сильным негативным контролем со стороны STAT6, но когда экспрессия мРНК PAX-5 снижается, ослабевает и ингибирующее влияние STAT6. Можно предположить, что несколько иной характер взаимоотношений уровней экспрессии pSTAT6 и мРНК PAX-5 в рассмотренных группах обусловлен «запаздывающей» реакцией концентрации pSTAT6 на изменение экспрессий STAT6 и PAX-5, так как pSTAT6 является вторичной формой активности по отношению к STAT6. Эти наблюдения не позволяют исключить наличие обратной связи между STAT6 и PAX-5, возможно,

за счет косвенного угнетения фактором PAX-5 активности STAT6.

С помощью кластерного анализа мы разделили обследованных пациентов на 3 группы по содержанию STAT6 (по отношению к бета-актину) в лимфоцитах: менее 0,3; 0,3-0,71 и больше 0,71. Для оценки предполагаемого вклада STAT6 в синтез мРНК PAX-5 мы провели дисперсионный анализ со значением кластера STAT6 как фактора. При увеличении содержания STAT6 экспрессия мРНК PAX-5 снижалась: $F = 5,427$ и $p = 0,006$ для всей обследованной популяции, $F = 7,594$ и $p = 0,002$ для пациентов с АБА.

В группах здоровых лиц и больных НАБА эта закономерность не была значимой.

Обсуждение

Транскрипционный фактор PAX-5 обладает несколькими функциями. Он не только переключает В-лимфоциты на продукцию IgE, но и обеспечивает приверженность В-клеток своей линии дифференцировки, препятствуя их апоптозу и превращению в плазматические клетки за счет угнетения плазмоцит-специфических генов. В процессе переключения на синтез IgE принимает участие также и фактор STAT6 [9]. STAT6 и PAX-5 также вовлечены в регуляцию экспрессии низкоафинного рецептора к IgE — FcεRII (CD23), который, в свою очередь, участвует в регуляции действия IgE [9]. С учетом существования в лимфоцитах целых каскадов транскрипционных факторов, которые взаимодействуют в процессе регуляции экспрессии одних и тех же молекул [11], нельзя исключить взаимовлияния белков STAT6 и PAX-5. Наличие отрицательной значимой корреляции между количеством белка STAT6 и мРНК PAX-5 позволяет предпо-

ложить, что STAT6 способен угнетать транскрипцию фактора PAX-5.

Ранее мы показали, что содержание сывороточного IgE не увеличивалось у лиц с высоким содержанием мРНК PAX-5 в лимфоцитах [4], предположив, что STAT6 вносит большой вклад в нарастание продукции IgE. Возможно, STAT6 супрессирует PAX-5 и способствует, таким образом, дифференцировке В-клеток в плазматические, которые являются основными продуцентами IgE. Данное предположение могут подтвердить наблюдения, свидетельствующие о снижении экспрессии мРНК PAX-5 в лимфоцитах, стимулированных IL-4 в течение 24 часов, ибо основной эффект этого цитокина проводится именно белком STAT6.

Канонической последовательностью ДНК, которую распознает STAT6, считается олигонуклеотидный участок 5'-TTC-(N₄)-GAA-3', где N соответствует любому нуклеотиду. Сайт связывания STAT6 может также содержать не 4, а 3 или 2 N [10]. В известной последовательности гена PAX-5 (NCBI Reference Sequence: NM_016734.1) нет подобных участков. Однако возможные участки связывания STAT6 есть в некодирующей области гена молекулы Id2 (NCBI Reference Sequence: NM_002166) и в нетранслируемой области транскрипционного фактора E2A (NCBI Reference Sequence: NM_003200.3).

Кофактор Id2 (Inhibitor of DNA binding 2) угнетает связывание с ДНК ряда транскрипционных факторов, в том числе связывание белков E2A с регуляторными участками гена PAX-5 [8]. Таким образом, можно предположить, что рост экспрессии STAT6 ведет к увеличению концентрации кофактора Id2, который препятствует связыванию с промотором гена PAX-5 транскрипционных факторов E2A, что в итоге влечет к снижению экспрессии PAX-5 (рис. 2).

Cavalcanti E. et al. [6], анализируя состояние CD8⁺T-лимфоцитов при почечно-клеточном раке, показали, что в этих клетках отмечается снижение концентрации как фактора STAT6, так и кофактора Id2, то есть экспрессия этих молекул изменяется однонаправленно. С другой стороны, можно предположить, что STAT6 регулирует и транскрипцию фактора E2A. По данным ряда исследователей, STAT6 может не только активировать транскрипцию, но и угнетать ее [7, 12].

Эти предполагаемые взаимодействия и тот факт, что при бронхиальной астме, с одной стороны, уменьшается сила и значимость корреляции между STAT6 и мРНК PAX-5 по сравнению со здоровыми лицами, а с другой — усиливает-

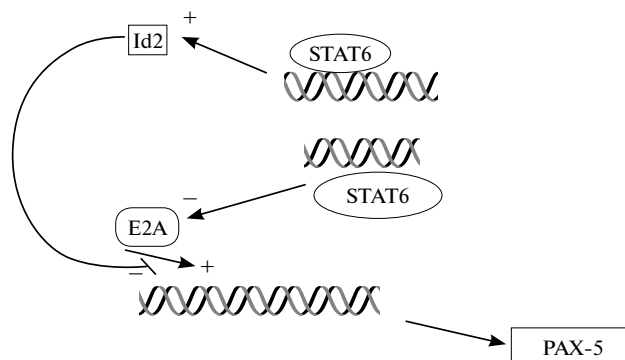


Рисунок 2. Предполагаемая схема регуляции экспрессии PAX-5 фактором STAT6

Примечание. Предполагается, что STAT6 активирует (+) транскрипцию кофактора Id2 и ингибирует (-) транскрипцию E2A. Кофактор Id2 препятствует транскрипционному фактору E2A в активации транскрипции PAX-5. Таким образом, STAT6 угнетает синтез PAX-5.

ся эта корреляция при нарастании эозинофилии крови и мокроты, по-видимому, указывают на дисбаланс взаимоотношения транскрипционных факторов при БА. Ранее нами было выявлено утяжеление проявлений БА у больных с высокими уровнями экспрессии STAT6 [5]. Возможно, это явление отчасти опосредовано через угнетение PAX-5 путем активации транскрипции Id2 и угнетения E2A.

В заключение можно отметить, что в В-лимфоцитах, несомненно, существует разветвленная сеть взаимодействующих транскрипционных факторов и кофакторов, регулирующих секреторную и антиген-представляющую активность этих клеток. Нарушение этого баланса может лежать в основе развития БА.

В частности, увеличение экспрессии STAT6, возможно, путем угнетения синтеза факторов E2A и активации транскрипции Id2, вызывает снижение продукции PAX-5. В то же время известно, что STAT6 наряду с PAX-5 участвует в переключении В-лимфоцитов на синтез IgE. Угнетение экспрессии PAX-5, с одной стороны, вероятно, препятствует избыточному переключению на IgE, являясь, таким образом, элементом обратной связи для этого процесса, а с другой стороны, по-видимому, позволяет В-клеткам активнее дифференцироваться в плазматические клетки.

Дальнейшее изучение и проверка этих предполагаемых взаимодействий позволят анализировать патогенез БА на новом уровне, что может выразиться в разработке новых «точечных» лекарственных мишеней.

Работа была частично поддержана в 2011-2012 гг. грантами Правительства Санкт-Петербурга для аспирантов.

Список литературы

1. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии (Часть I) // Аллергология. — 2005. — № 4. — С. 38-44.
 2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии: механизмы негативной регуляции (Часть II) // Аллергология. — 2006. — № 1. — С. 49-55.
 3. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А. Влияние IL-4 на активность транскрипционного фактора STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. — 2009. — Т. 11, № 2-3. — С. 177-184.
 4. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Иванов В.А., Липкин Г.И. Роль транскрипционного фактора PAX-5 в патогенезе бронхиальной астмы // Медицинская иммунология. — 2012. — Т. 14, № 4-5. — С. 347-352.
 5. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И. Фундаментальные и клинические аспекты JAK-STAT-сигналикации. — СПб.: ВВМ, 2010. — 120 с.
- Ссылки 6-13 см. в References (смр. 42). See References for numbers 6-13 at p. 42.

References

1. Mineev V.N., Sorokina L.N. Sovremennye predstavleniya o JAK-STAT sisteme kak novoy signal'noy sisteme i ee narusheniyakh pri immunnoy patologii (Chast' I) [Modern conceptions about JAK-STAT system as new signal system and about its defects in immune pathology (Part I)]. *Allergologiya — Allergy*, 2005, no. 4, pp. 38-44.
2. Mineev V.N., Sorokina L.N. Sovremennye predstavleniya o JAK-STAT sisteme kak novoy signal'noy sisteme i ee narusheniyakh pri immunnoy patologii: mekhanizmy negativnoy regul'yatsii (Chast' II) [Modern conceptions about JAK-STAT system as new signal system and about its defects in immune pathology: mechanisms of negative regulation (Part II)]. *Allergologiya — Allergy*, 2006, no. 1, pp. 49-55.
3. Mineev V.N., Sorokina L.N., Nioma M.A. Vliyaniye IL-4 na aktivnost' transkriptsiionnogo faktora STAT6 v limfotsitakh perifericheskoy krovi bol'nykh bronkhial'noy astmoy [Effects of IL-4 upon the activity of STAT6 transcription factor in peripheral blood lymphocytes in bronchial asthma]. *Meditinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2009, vol. 11, no. 2-3, pp. 49-55.
4. Mineev V.N., Sorokina L.N., Nioma M.A. Ivanov V.A., Lipkin G.I. Rol' transkriptsiionnogo faktora PAX-5 v patogeneze bronkhial'noy astmy [Role of PAX-5 transcription factor in pathogenesis of bronchial asthma]. *Meditinskaya immunologiya — Medical Immunology*, 2012, vol. 14, no. 4-5, pp. 347-352.
5. Mineev V.N., Sorokina L.N., Nioma M.A. Ivanov V.A., Lipkin G.I. Fundamental'nye i klinicheskie aspekty JAK-STAT-signalizatsii [Fundamental and clinic aspects of JAK-STAT-signalization]. *St. Petersburg, VVM*, 2010. 120 p.
6. Cavalcanti E., Gigante M., Mancini V., Battaglia M., Ditunno P., Capobianco C., Cincione R.I., Selvaggi F.P., Herr W., Storkus W.J., Gesualdo L., Ranieri E. JAK3/STAT5/6 pathway alterations are associated with immune deviation in CD8 T cells in renal cell carcinoma patients. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2010, vol. 2010: 935764.
7. Cheng J., Liu J., Shi Z., Xu D., Luo S., Siegal G.P., Feng X., Wei S. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced NFATc1 expression via STAT6: a novel mechanism mediating its blockade of osteoclastogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 2011, vol. 112, no. 11, pp. 3385-3392.
8. Gonda H., Sugai M., Nambu Y., Katakai T., Agata Y., Mori K.J., Yokota Y., Shimizu A. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.*, 2003, vol. 198, no. 9, pp. 1427-1437.
9. Gould H.J., Beavil R.L., Vercelli D. IgE isotype determination: epsilon-germline gene transcription, DNA recombination and B-cell differentiation. *Br. Med. Bull.*, 2000, vol. 56, no. 4, pp. 908-924.
10. Kanai A., Suzuki K., Tanimoto K., Mizushima-Sugano J., Suzuki Y., Sugano S. Characterization of STAT6 target genes in human B cells and lung epithelial cells. *DNA Res.*, 2011, no. 5, pp. 379-392.
11. Shen C.H., Stavnezer J. Interaction of stat6 and NF-kappaB: direct association and synergistic activation of interleukin-4-induced transcription. *Mol. Cell Biol.*, 1998, vol. 18, pp. 3395-3404.
12. Souza P.P., Palmqvist P., Lundberg P., Lundgren I., Hännström L., Souza J.A., Conaway H.H., Lerner U.H. Interleukin-4 and interleukin-13 inhibit the expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 in fibroblasts. *Mol. Immunol.*, 2012, vol. 4, no. 4, pp. 601-610.
13. Visan I.A. The CD23 receptor-regulation of expression and signal transduction: Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades / Bayerische Julius-Maximilian Universität Würzburg vorgelegt von. *Würzburg*, 2003. 116 p. www.opusbayern.de/uniwuerzburg/volltexte/2003/555/pdf/The_CD23_receptor-regulation_of_expression_and_signal_trans.pdf.